



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estudo da Influência da Flora Intestinal do
Mosquito *Anopheles* sp. no Estabelecimento da
Infecção por *Plasmodium berghei***

Joana da Graça Matias Gomes

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE TROPICAL

OUTUBRO, 2012



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estudo da Influência da Flora Intestinal do
Mosquito *Anopheles* sp. no Estabelecimento da
Infecção por *Plasmodium berghei***

Joana da Graça Matias Gomes

Licenciada em Biologia, ramo Biotecnologia pela Universidade do Açores
Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários obtenção do grau
de Mestre em Saúde Tropical

Orientador: Professor Doutor Henrique Silveira
Unidade de Parasitologia Médica
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

OUTUBRO, 2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Professor Doutor Henrique Silveira pela orientação desta tese e por todo apoio e motivação dados durante a sua realização.

Ao Professor Doutor Jorge Atougua, Professor Doutor Jorge Seixas e Professora Doutora Sónia Lima pela oportunidade de realizar este mestrado.

À Professora Doutora Isabel Sá-Correia e Doutora Carla Coutinho, do Instituto Superior Técnico, pelas bactérias e apoio na manipulação das mesmas.

À Professora Doutora Isabel Couto e Sofia Costa pelo apoio demonstrado e acompanhamento inicial na parte das culturas.

À Catarina Alves pela ajuda com os mosquitos e motivação.

À Luísa Simões pela ajuda com o tratamento estatístico dos resultados.

Às minhas colegas Isa Pires, Ana Custódio e Marta Machado pela amizade e motivação ao longo deste mestrado.

A Filipa Ferreira a amizade e apoio demonstrados.

Resumo

Estudo da Influência da Flora Intestinal do Mosquito *Anopheles* sp. no Estabelecimento da Infecção por *Plasmodium berghei*

Joana da Graça Matias Gomes

PALAVRAS-CHAVE: *Plasmodium berghei*, Microbiota, *Pseudomonas aeruginosa*, coinfeção, oocistos, biofilme

A malária é uma doença infecciosa com um efeito devastador nas áreas afectadas. É provocada pelo protozoário *Plasmodium* e transmitida pelo insecto vector do género *Anopheles*. As fêmeas hematófagas ao alimentar-se de um hospedeiro infectado vão dar continuidade ao ciclo de vida do parasita e transmiti-lo a um novo hospedeiro na próxima refeição sanguínea. O intestino médio dos mosquitos é um órgão imunocompetente, onde a presença de microrganismos vai activar o sistema imunitário, determinando a sua capacidade vectorial.

Novas abordagens de controlo biológico de doenças transmitidas por vectores parecem ganhar terreno. *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, potencialmente patogénica, em especial as estirpes produtoras de muco, sendo um microrganismo modelo em estudos de biofilmes. Estes são caracterizados por conferir tolerância a antibióticos e resistência ao sistema imune do hospedeiro. Com este trabalho pretendeu-se analisar o efeito da influência da flora bacteriana, nomeadamente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de muco e não produtores, presentes no tracto digestivo de *Anopheles* sp. e a sua relação com a infecção por *P. berghei*.

Com este estudo é possível afirmar a existência de uma proporcionalidade directa entre a taxa de infecção por *P. berghei* e a ausência da Microbiota. A presença de *Pseudomonas* produtoras de muco no intestino médio dos mosquitos demonstrou conferir algum grau de protecção no estabelecimento da infecção, bem como na intensidade da mesma. Contudo, mais estudos necessitam ser realizados e com um maior número de mosquitos, de forma a ultrapassar as limitações impostas pelo tratamento antibacteriano. Possivelmente, a sobreposição de respostas imunes antibacterianas e anti-*Plasmodium*, vão provocar um incremento no sistema imune e limitação das infecções por *Plasmodium*. Biofilmes bacterianos têm demonstrado a capacidade de aderir e inibir o crescimento de protozoários

Uma melhor compreensão do papel da flora microbiana face ao sistema de defesa do hospedeiro poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo da transmissão da malária.

Abstract

Study of the Influence of *Anopheles* Midgut Microbiota in the *Plasmodium berghei* Infection Establishment

Joana da Graça Matias Gomes

KEYWORDS: *Plasmodium berghei*, Microbiota, *Pseudomonas aeruginosa*, coinfection, oocysts, biofilm

Malaria is an infectious disease with a devastating impact on the affected areas. It is caused by the protozoan *Plasmodium* and transmitted by the insect vector of the genus *Anopheles*. Hematofagous females, feeding on an infected host, will continue the life cycle of the parasite and pass it to a new host in the next blood meal. Insect midgut is an immunocompetent organ, where the presence of microorganisms will activate the immune system, thus, determining vector ability.

New approaches to biological control of vector-borne diseases appear to be gaining ground. *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacteria, potentially pathogenic, especially mucoid strains, being a model microorganism in biofilm studies. *Pseudomonas* are characterized by confer resistance to antibiotics and resistance to the host immune system. With this study we intended to analyze the effect of Microbiota, specially mucoid and non-mucoid *P. aeruginosa* strains, in the gut of *Anopheles* mosquitoes and its relation with infection by *P. berghei*.

With this study we can observe a direct proportionality between *P. berghei* infection rate and the absence of midgut microorganisms. The presence of mucus-producing *Pseudomonas* in the mosquito gut demonstrated the ability to confer some protection degree against *P. berghei* infection establishment as well as in infection intensity. However, further studies should be performed in order to overcome the limitations imposed by antibacterial treatment. Possibly the overlapping between antibacterial immune responses and anti-*Plasmodium*, will cause an increase in the immune system and the limitation of *Plasmodium* infection. Bacterial biofilms have demonstrated the ability to adhere and inhibit protozoans growth.

A better understanding of microbial role against host defense system may contribute to the development of new control strategies for malaria transmission.

Índice

Resumo	II
Abstract	III
Lista de Abreviaturas	1
Introdução	2
Malária	3
Vector <i>Anopheles</i> / Parasita <i>Plasmodium</i>	4
Ciclo de Vida	5
O Intestino Médio de <i>Anopheles</i> sp.	7
Novas Perspectivas no Controlo do Vector	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a Produção de Biofilme.....	12
Objectivo e Desenho Experimental	16
Objectivo	17
Desenho Experimental.....	17
Metodologia	18
Análise metagenómica de <i>Anopheles gambiae</i> infectados e não infectados com <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Determinação das curvas de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dos isolados mucoso e não mucoso	20
Esterilização bacteriana e infecção de mosquitos <i>Anopheles stephensi</i>	21
Infecção dos mosquitos com <i>Plasmodium berghei</i>	24
Isolamento de bactérias do intestino médio de <i>Anopheles stephensi</i>	25
Contagem de oocistos	26
Resultados	27
Análise metagenómica de <i>Anopheles gambiae</i> infectados e não infectados com <i>Plasmodium falciparum</i>	28
Curvas de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dos isolados mucoso e não mucoso	29
Infecção dos mosquitos com <i>Plasmodium berghei</i>	30
Isolamento de bactérias do intestino médio de <i>Anopheles stephensi</i>	31

Contagem de oocistos	33
Discussão dos Resultados / Conclusões	36
Referências Bibliográficas.....	45
Lista de Ilustrações	52
Lista de Tabelas	55
Anexos	56

Lista de Abreviaturas

Antib – Antibióticos

CO₂ – Dióxido de carbono

Cont – Controlo

DNA – Deoxyribonucleic acid

EPS – Extracellular polymeric substance

GFP – Green Fluorescent Protein

LB – Luria-Bertania Broth

OTU – Unidades taxonómicas operacionais

PaM – *Pseudomonas aeruginosa* isolado mucoso

PAMPs – Pathogen-associated molecular patterns

PaNM – *Pseudomonas aeruginosa* isolado não mucoso

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCR – Polymerase chain reaction

PGN – Peptidoglicano

PGRPs – Peptidoglycan Recognition Proteins

PMN's – Células polimorfonucleares

PRR – Pattern recognition receptor

ROS – Reactive Oxygen Species

TSA – Trypticase Soy Agar

Introdução

Malária

A malária é uma doença infecciosa causada pelo parasita *Plasmodium* sp. e transmitida pelo insecto vector, *Anopheles* sp. nas regiões endémicas, a malária apresenta-se como um grave problema de saúde pública e com um impacte devastador sobre a população nos países em vias de desenvolvimento, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais de África subsariana (Figura 1). Aqui, estima-se que anualmente cerca de 1 milhão de mortes são resultado só da infecção por *Plasmodium falciparum* (Aly *et al.*, 2010).

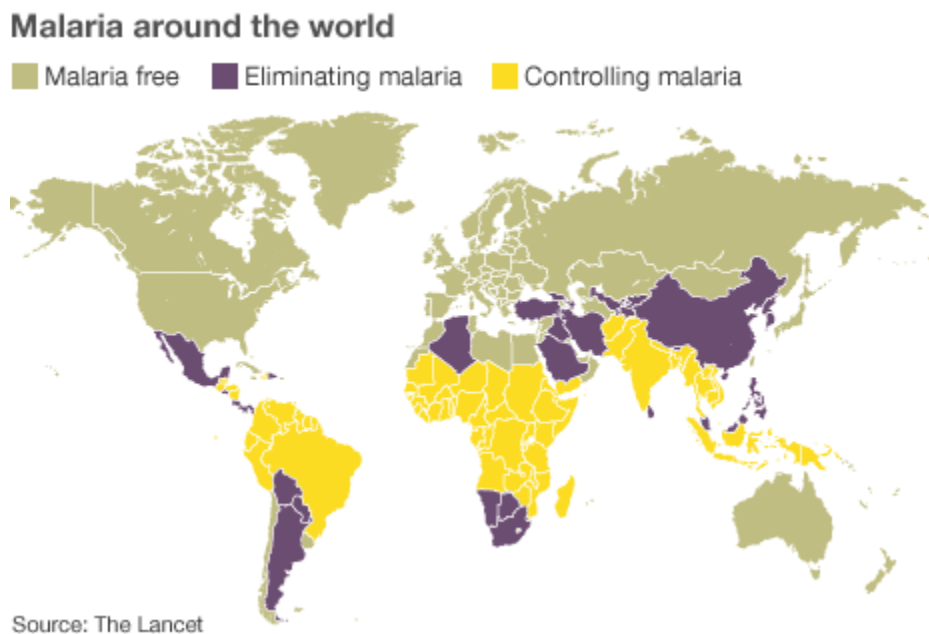


Figura 1. Distribuição mundial da malária, com referência às zonas em fase de eliminação da transmissão e zonas de controlo da infecção. Adapado de: <http://www.talkafrique.com/issues/eradicating-malaria-not-anytime-soon>.

Uma variedade de factores podem explicar efeito devastador da malária nas regiões endémicas, nomeadamente a combinação de uma elevada taxa de transmissão por um vector bastante eficiente; uma espécie predominante e mais agressiva do parasita (*P.falciparum*) associada a uma maior taxa de casos de malária grave e as condições ambientais locais propícias à transmissão da infecção. Além das características ambientais e vectorais mencionadas, a sua conjugação com os baixos recursos da população e instabilidade sócio-económica, prejudiciais a eficientes

programas de controlo, vão acentuar ainda mais o efeito negativo e consequências da malária sobre a população (CDC, 2012).

Nas regiões com mais altos níveis de transmissão, entre os grupos mais vulneráveis à doença, destacam-se aqueles cuja imunidade se encontra comprometida. Entre os grupos de risco, salientam-se as crianças, as mulheres grávidas e os viajantes ou migrantes (CDC, 2012).

Vector *Anopheles* / Parasita *Plasmodium*

Os mosquitos são insectos transmissores de uma vasta multiplicidade de doenças virais e parasitárias, sendo que a malária permanece a mais devastadora (Mendes *et al.*, 2011). É transmitida ao ser humano através de fêmeas do género *Anopheles*, que apesar de apresentar uma distribuição mundial, os mosquitos vectores de *Plasmodium* sp. encontram-se principalmente associados a condições ideais de temperatura e humidade, características das regiões tropicais e subtropicais (CDC, 2012). O vector *Anopheles gambiae*, amplamente distribuído nas regiões endémicas de África subsariana, é o mais importante vector associado à transmissão de *P. falciparum* (Mitri *et al.*, 2009). *A. sthephensi*, também importante vector na transmissão da malária, tem a sua distribuição localizada no Continente asiático (Damiani *et al.*, 2009).

Ao longo do desenvolvimento, como qualquer outro mosquito, *Anopheles* sp. compreende 4 fases de desenvolvimento, nomeadamente: ovo, larva (L₁, L₂, L₃ e L₄), pupa e adulto (macho e fêmea). A postura dos ovos é efectuada pelas fêmeas, após a ingestão de sangue, directamente na água. Após a eclosão dos ovos, larvas aquáticas vão-se desenvolver ao longo de 4 instars, onde por metamorfose as larvas L₄ vão dar origem às pupas. A partir das pupas vão emergir os mosquitos adultos. Enquanto que os machos se alimentam apenas de néctar ou outras fontes de açúcar, para realizar a postura as fêmeas necessitam ainda de uma refeição sanguínea, para o desenvolvimento dos ovos (CDC, 2012).

Ciclo de Vida

O primeiro contacto entre mosquito vector e parasita tem lugar na membrana epitelial do tracto digestivo do insecto e ocorre após a ingestão de eritrócitos infectados durante a refeição sanguínea, a partir de um hospedeiro infectado (Azambuja *et al.*, 2005). Desta forma, a transmissão de *Plasmodium* pelo mosquito *Anopheles*, é possibilitado pelo fenómeno da hematofagia, cuja ingestão de sangue pelas fêmeas do insecto hematófago é fundamental para a ovogénese (Mitri & Vernick, 2012).

Durante a refeição sanguínea, as fêmeas vão ingerir os gametócitos presentes no sangue periférico do hospedeiro. No lúmen do intestino médio, vai ocorrer a gametogénese e após a fertilização dos gametócitos vão se formar os zigotos. As alterações de habitat do parasita estão sempre associadas a grandes flutuações na densidade populacional (Aly *et al.*, 2012) e nesta fase do ciclo de vida a população parasitária vai sofrer uma significativa redução (efeito de Bottleneck) (figura 2). Apesar da elevada importância desta etapa no ciclo parasitário, os mecanismos responsáveis por esta redução drástica no número de parasitas não se encontram esclarecidos (Azambuja *et al.*, 2005), além da pressão imposta pelo sistema de defesa, outros mecanismos poderão encontrar associados a esta redução, tais como a produção de enzimas digestivas, a presença de uma flora intestinal Microbiota do mosquito (Dong *et al.*, 2009), lectinas,

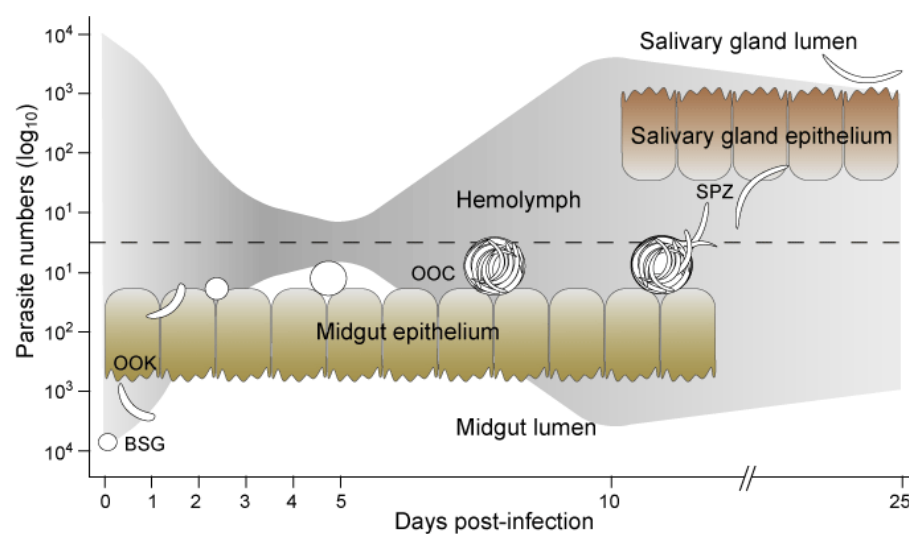


Figura 2. Efeito de Bottleneck, onde se observa uma redução significativa do número de oocistos no intestino médio de *Anopheles*. Adaptado de: <http://kafatos.openwetware.org/Research.html>.

péptidos antimicrobianos e óxido nítrico (Azambuja *et al.*, 2005).

Apesar desta redução drástica da população parasitária, os oocistos remanescentes vão ser suficientes para o ciclo de vida do parasita seguir o seu curso e a transmissão persistir (Cirimotich *et al.*, 2011b).

Após a diferenciação dos oocinetos móveis, estes vão atravessar a matriz peritrófica e vão-se alojar na lâmina basal, onde vão-se desenvolver em oocistos imóveis (Aly *et al.*, 2010) (Figura 3).

A partir dos oocistos vão-se formar os esporozoítos, que vão ser libertados na cavidade corporal dos mosquitos, onde posteriormente alcançarão e invadirão as glândulas salivares (Aly *et al.*, 2010).

Quando os esporozoítos alcançam as glândulas salivares, os mosquitos tornam-se infectantes e poderão ser transmitidos ao hospedeiro na refeição sanguínea subsequente.

O início do novo ciclo parasitário, no hospedeiro mamífero, vai ter origem na invasão do fígado pelos esporozoítos inoculados, aquando da ingestão de sangue por uma fêmea infectada (Aly *et al.*, 2010). Após a invasão dos hepatócitos, vai ocorrer a diferenciação em esquizontes que contêm milhares de merozoítos, que após a ruptura do esquizonte serão libertados na corrente sanguínea, onde irão iniciar a fase eritrocitária do seu ciclo de vida (Lau *et al.*, 2000) (Figura 4).

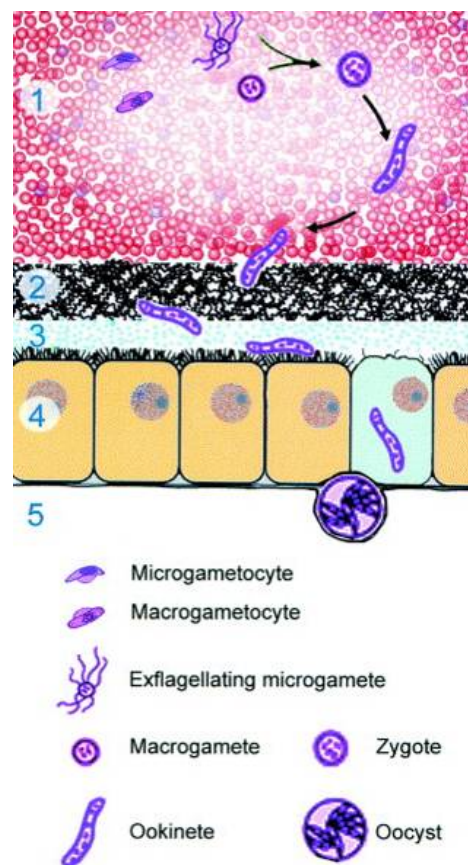


Figura 3. Desenvolvimento de *Plasmodium* no intestino médio do mosquito vetor. 1- Gametogénese, fertilização e transformação do zigoto; 2- Invasão da matriz peritrófica; 3- Redução do nº de oocinetos invasores no espaço ectopitrófico; 4- Invasão do epitélio intestinal 5- Adesão dos oocinetos e desenvolvimento dos oocistos. Adaptado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475898013489>.

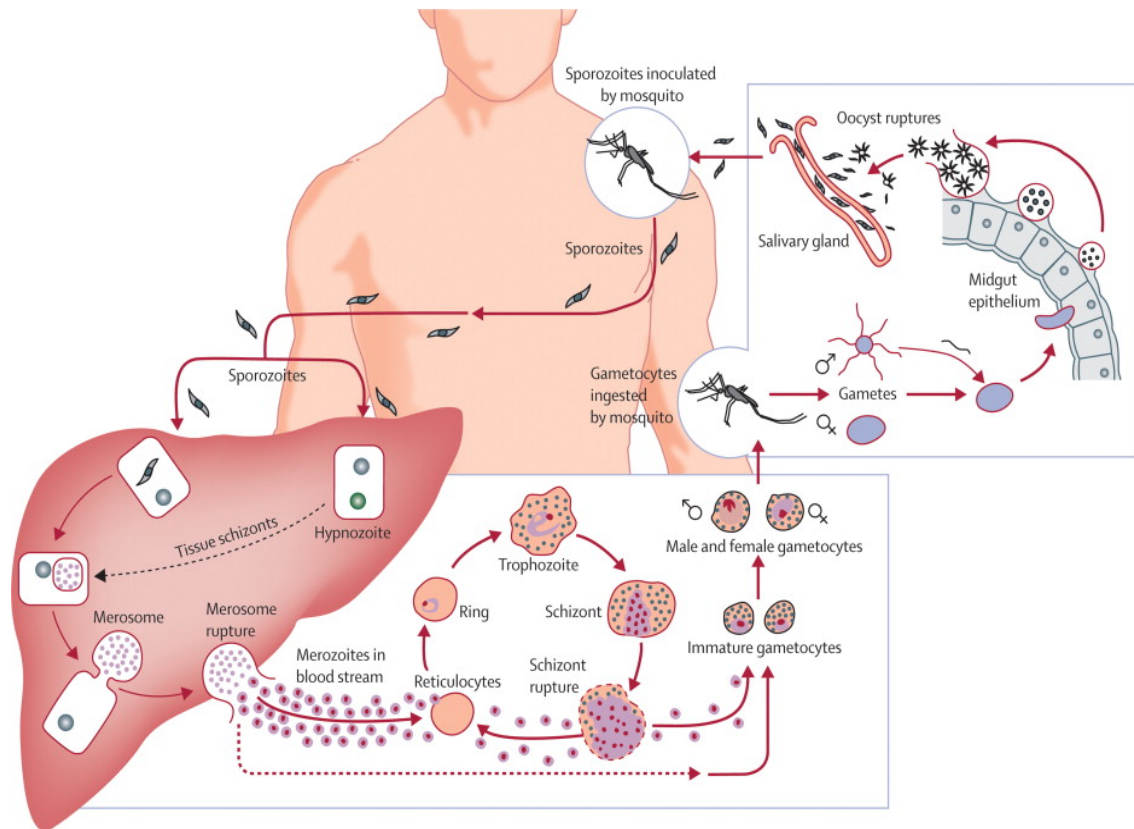


Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium*. Desenvolvimento no mosquito vetor e infecção no hospedeiro mamífero. Adaptado de: <http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS147330990970177X/images?imageId=gr1§ionType=green&hasDownloadImagesLink=true>.

O Intestino Médio de *Anopheles* sp.

Todos os organismos complexos são colonizados por uma vasta multiplicidade de microrganismos, exemplo disso são os microrganismos constituintes da flora microbiana nativa que coloniza o tracto digestivo, local onde se observa a maior quantidade e diversidade de bactérias. Esta colonização bacteriana, de um modo geral, confere benefícios ao hospedeiro revelando-se uma verdadeira relação mutualista (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

O sucesso dos insectos nos diferentes ecossistemas permitiu criar assim, um conjunto de oportunidades ambientais para a sua colonização pelas bactérias, tornando-se mesmo vantajoso para o hospedeiro, como por exemplo, ao nível da obtenção e utilização de produtos resultantes do metabolismo bacteriano (Dillon & Dillon, 2004).

Tornou-se ainda universalmente aceite, que os microrganismos endossimbiontes têm uma influência profunda na persistência e competência do vector no seu habitat natural (Rani *et al.*, 2009).

Dillon & Dillon, 2004 define uma relação simbiótica de um microrganismo no tubo digestivo de um insecto hospedeiro como a aquisição e manutenção desse microrganismo, que resulta na aquisição de novas estruturas ou metabolismos. Assim, a diversidade Microbiota relaciona uma variedade de estruturas especializadas presentes no tubo digestivo (ex. sistema imune), com o efeito do pH, condições redox, enzimas digestivas e tipo de alimentação (ex. hematofagia).

O tracto digestivo do mosquito é o habitat de diversas comunidades microbianas que constituem a flora Microbiota, cuja grande maioria destas populações são bactérias Gram-negativas e pertencem ao grupo das Proteobacterias e Enterobacterias (Meister *et al.*, 2009).

A membrana epitelial do intestino médio do mosquito representa o primeiro ponto de contacto entre parasita e insecto vector e consiste na primeira oportunidade do parasita aderir e invadir os tecidos subjacentes, e consequentemente estabelecer infecção (Azambuja *et al.*, 2005). O intestino médio é um órgão imunocompetente e a presença de microrganismos vai induzir uma resposta imunitária (Rani *et al.*, 2009). Da interacção entre bactérias simbióticas, parasitas invasores e sistema imune, resulta a activação da principal barreira de defesa do hospedeiro, o sistema imunitário do mosquito, onde vão ter origem uma série de processos e factores imunes que vão culminar numa redução da população parasitária (Dong *et al.*, 2006b), além de desempenhar um papel preponderante na susceptibilidade/resistência do mosquito à infecção por plasmódio (Meister *et al.*, 2009).

Durante a infecção do hospedeiro invertebrado, o plasmódio depara-se com diversos obstáculos ao longo dos diversos estágios de desenvolvimento e transições espaciais. A principal barreira a ultrapassar, como referido, é o epitélio do intestino médio, onde o oocineto ao atravessar vai sofrer a pressão do sistema imunitário do hospedeiro (Dong *et al.*, 2006a)

A imunidade inata dos mosquitos desempenha um papel muito importante na interacção entre vector e parasita, ou agente patogénico, o que vai determinar a

capacidade vectorial do mosquito. Enquanto que a exposição dos mosquitos a determinados microrganismos pode ser bastante extensa, os mecanismos moleculares responsáveis pelo reconhecimento desta vasta diversidade ainda não são completamente compreendidos (Dong & Dimopoulos, 2009).

O sistema de defesa dos mosquitos é composto por mecanismos celulares e humorais que são activados após o reconhecimento de agentes patogénicos invasores por receptores moleculares específicos (PRR). O reconhecimento destes padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) vai activar indirectamente uma série de mecanismos de defesa que controla a transcrição de genes efectores, ou vai actuar directamente através de mecanismos de encapsulação e fagocitose (Dong & Dimopoulos, 2009).

No entanto, estes sistemas de vigilância imunitária carecem de reconhecimento mediado por anticorpos e por isso, assentam num conjunto relativamente limitado de receptores que reconhecem padrões de moléculas invariantes e evolutivamente conservadas na superfície dos agentes patogénicos (Dong & Dimopoulos, 2009).

A sinalização imunológica é desencadeada após reconhecimento de estruturas conservadas microbianas específicas, comuns às bactérias mas ausentes no hospedeiro, cujo reconhecimento é essencial para a activação da imunidade inata do insecto. Um destes exemplos é o peptidoglicano (PGN), constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e que pode estar na origem do reconhecimento específico por proteínas como as PGRPs (Meister *et al.*, 2009).

Estudos sobre a flora microbiana do tracto digestivo de insectos assentam, sobretudo, na contribuição dos microrganismos endosimbiontes para a homeostase nutricional do hospedeiro. Recentemente tem sido demonstrado que a presença de uma flora bacteriana natural, no intestino médio de *Anopheles* sp., quer em insectos de laboratório quer na Natureza, desempenha um papel preponderante na prevenção do desenvolvimento parasitário de *Plasmodium* sp. Dong *et al.* 2009, afirma que a presença de bactérias é responsável pela activação de respostas imunitárias antimicrobianas no intestino médio dos mosquitos, onde péptidos sintetizados e outros factores imunes vão actuar contra a infecção com *P. berghei*.

Actualmente vários métodos são aplicados na identificação de bactérias, em mosquitos do género *Anopheles*, capturados em campo, recorrendo a técnicas de cultura de bactérias. Apesar da flora bacteriana variar em função da distribuição geográfica e nichos ecológicos ocupados pelos mosquitos, têm sido abundantemente detectadas as bactérias *Pseudomonas cepacia*, *Enterobacter agglomerans* e *Flavobacterium* spp., associadas à flora bacteriana de *A. stephensi* e *A. gambiae* criados em laboratório (Rani *et al.*, 2009).

A diversidade bacteriana nas espécies de *Anopheles* é assumida como sendo particularmente baixa no estágio de adulto, devido à renovação do tracto digestivo durante a metamorfose de pupa para adulto (Boissière *et al.*, 2012). A microflora nos mosquitos adultos apresenta ainda uma composição diferente, devido às transições metamórficas a eliminação da microflora dos estádios larvares está associada à aquisição de um novo set de microrganismos (Rani *et al.*, 2009). Estas bactérias terão sido adquiridas, naturalmente, do ambiente aquático durante o desenvolvimento dos estágios imaturos, no entanto transmissão vertical também se encontra documentada (Boissière *et al.*, 2012).

Apesar de permanecerem desconhecidos os mecanismos responsáveis pela colonização do trato digestivo dos mosquitos vectores adultos, por bactérias da microflora intestinal no seu habitat natural, sabe-se que a aquisição de uma flora intestinal bacteriana, em meio laboratorial, pode ocorrer verticalmente ou por via alimentar, através de soluções de açúcar ou durante refeições sanguíneas contaminadas (Rani *et al.*, 2009).

A correcta identificação das bactérias Gram-negativas, frequentemente encontradas no tubo digestivo dos mosquitos e constituintes da flora Microbiota, assim como os mecanismos fisiológicos associados, podem contribuir para uma melhor compreensão da dinâmica da co-infecção com *Plasmodium* e definição de novas estratégias de controlo (Azambuja *et al.*, 2005).

Novas Perspectivas no Controlo do Vector

Actualmente, e ao longo das últimas décadas, as estratégias de controlo da malária, têm consistido primariamente no uso de insecticidas para reduzir as populações de vectores e a utilização de fármacos para eliminar o parasita (Riehle *et al.*, 2005). Mais ainda, os procedimentos utilizados para medir as taxas de transmissão não se encontram padronizados, nem consideram as diferenças ecológicas, demográficas e sócio-económicas da população (Kelly-Hope & McKenzie, 2009).

A compreensão de como as interações *Anopheles-Plasmodium* contribuem para a competência vectorial do mosquito, tem sido recentemente alvo de elevada atenção, abrindo caminho para a aquisição de novas estratégias no controlo da malária (Boissière *et al.*, 2012).

Actualmente, o principal objectivo de um programa de controlo da malária, não deve consistir apenas na eliminação do parasita, mas na interferência na sua transmissão pelos mosquitos vectores (Riehle & Jacobs-Lorena, 2005). Técnicas de modificação genética têm sido desenvolvidas para *A. gambiae* e *A. stephensi* (Boissière *et al.*, 2012). A ideia de substituir as populações de vectores naturais por outras alteradas geneticamente, capazes de actuar directamente sobre infecções por *Plasmodium*, recebe actualmente particular atenção. Existem modelos para alterar geneticamente os mosquitos, estão identificadas moléculas efectoras capazes de actuar sobre os parasitas e estão identificados promotores específicos para expressar as moléculas efectoras no tempo e local apropriado (Riehle & Jacobs-Lorena, 2005). No entanto, a utilização de mosquitos transgénicos está associada a uma diminuição da sua *fitness* (Boissière *et al.*, 2012), além que seria ainda necessário ultrapassar as limitações associadas ao método para substituir as populações de mosquitos naturais, pelas refractárias à infecção por *Plasmodium* (Riehle & Jacobs-Lorena, 2005).

Recentemente têm sido exploradas outras hipóteses associadas à utilização de microrganismos como agentes de controlo biológico de doenças transmitidas por vectores. A susceptibilidade de *Anopheles* à infecção por *Plasmodium* está sobre controlo genético, no entanto a elevada variabilidade no número de oocistos em espécies de mosquitos relativamente próximas indica que os factores ambientais

também podem influenciar. Várias evidências sugerem que a flora bacteriana do mosquito tem influência na sua competência vectorial (Boissière *et al.*, 2012).

As bactérias presentes no lúmen do intestino médio dos mosquitos interagem directamente e adversamente, contra os diferentes estádios de desenvolvimento de *Plasmodium* presentes na refeição sanguínea através da produção de enzimas, toxinas e barreira física que inibem a interacção entre os oocinetos e o epitélio do intestino médio. Alternativamente, o efeito bacteriano no desenvolvimento do parasita pode ocorrer através de alterações na fisiologia do próprio mosquito hospedeiro. Aqui, a indução do sistema imune vai actuar de forma cruzada sobre bactérias e *Plasmodium* (Dong *et al.*, 2009b).

Pseudomonas aeruginosa e a Produção de Biofilme

P. aeruginosa é um microrganismo ubíquo que ocupa um elevado leque de nichos ecológicos (Drenkard, 2003). Enquanto algumas espécies residem no seu habitat natural, outras têm propensão para causar doença (Mann & Wozniak, 2012). É uma bactéria Gram-negativa potencialmente patogénica para o ser humano cuja importância médica reside na sua natureza oportunista, quando associada a um sistema imunitário imunocomprometido. Uma das suas características mais importantes é a capacidade de produzir biofilme (Ma *et al.*, 2012). Infecções persistentes causadas por bactérias produtoras de biofilme estão associadas a um elevado número de condições médicas, com especial referência à fibrose quística. Como consequência, este tipo de infecções geralmente são crónicas e difíceis de tratar (Drenkard, 2003).

Nos biofilmes produzidos por *P. aeruginosa*, células bacterianas individuais iniciam a aderência a um substrato, seguindo-se uma propagação clonal, construção da matriz e maturação do biofilme (Mann & Wozniak, 2012). Em termos espaciais, o ciclo de formação destas matrizes traduz-se em 5 fases, que têm início com a adesão de células livres a uma superfície, seguindo-se a formação de microcolónias e por fim a dispersão, onde se libertam células das microcolónias para ocupar novas superfícies (Ma *et al.*, 2009) (Figura 5).

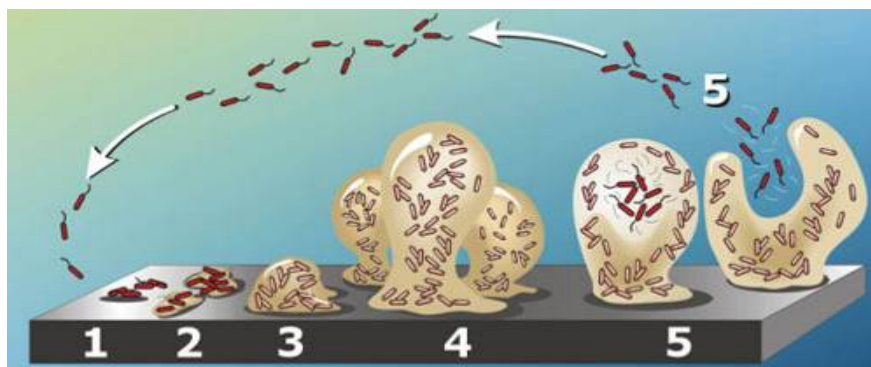


Figura 5. Fases da formação do biofilme por *P. aeruginosa*. 1- Adesão inicial; 2- Adesão irreversível; 3- Maturação I; 4- Maturação II e 5- Dispersão. Adaptado de http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa.

P. aeruginosa é um microrganismo modelo na investigação de biofilmes. Estes têm sido tema de intenso estudo na última década por dois motivos principais. Primeiro no sentido de estudar as bactérias, procurando perceber a natureza das comunidades multicelulares, e por fim, a formação de biofilmes provoca sérios problemas médicos e industriais, uma vez que as bactérias presentes nestas matrizes podem resistir não só ao tratamento antibiótico mas também às respostas imunitárias do hospedeiro (Harmsen *et al.*, 2010).

Os biofilmes ou comunidades de bactérias estruturadas associadas a superfícies são mantidos por uma substância extracelular polimérica extracelular (EPS), responsável por manter a arquitetura e funções como matriz, sustentando as células do biofilme. A matriz ou EPS de *P. aeruginosa* consiste numa mistura pouco definida de polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas, onde um dos principais constituintes que contribui para a formação do biofilme é o alginato (Ma *et al.*, 2009). Este polissacarídeo, de elevado peso molecular, é fundamental para a estabilidade estrutural do biofilme, onde eventos genéticos específicos podem dar origem a uma sobreprodução nos fenótipos mucoides (Mann & Wozniak, 2012) (Figura 6).

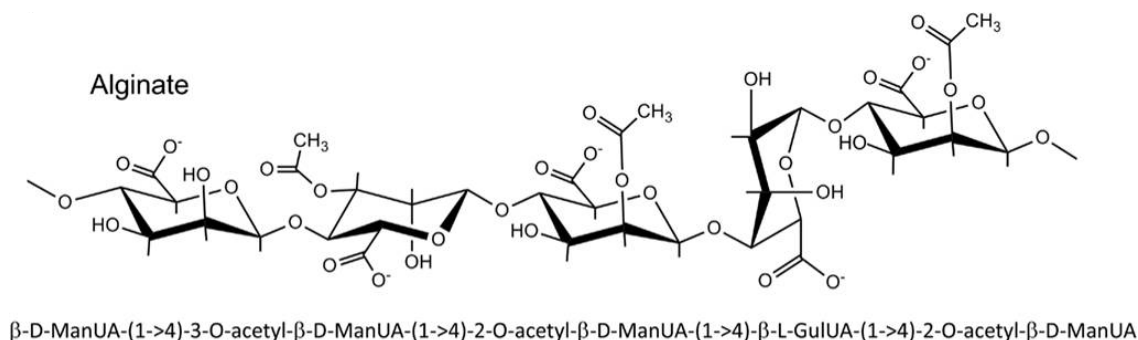


Figura 6. Estrutura química possível do alginato produzido por *P. aeruginosa*, resíduos de ácido D-manurônico intercalados com resíduos de ácido L-gulurônico (Franklin *et al.*, 2011.)

A EPS alberga as células bacterianas do biofilme, consequentemente desempenha um papel preponderante em diversos processos associados à adesão bacteriana, interconexão celular, interações entre subpopulações, tolerância e trocas de material genético (Harmsen *et al.*, 2010). Devido a estes factos, de um modo geral, pode-se afirmar que a matriz exopolissacrídea providencia uma barreira efectiva que restringe a entrada de biocidas quimicamente reactivos, antibióticos catiónicos e péptidos antibióticos (Drenkkard, 2003).

Além da sua capacidade estrutural, os biofilmes são considerados como uma comunidade funcional de células bacterianas, alcançando como comunidade o que espécies isoladas não conseguem. Ou seja, nesta associação sinérgica as propriedades da comunidade no interior da matriz são superiores ao somatório das propriedades individuais de cada subpopulação (Sutherland, 2001).

Dos principais compostos sintetizados pelas *Pseudomonas*, além da EPS, destacam-se os biossurfactantes e os sideróforos. O biossurfactante ramnolipídeo desempenha múltiplas funções na formação do biofilme, sendo necessário para a manutenção dos canais, bem como para a migração das células móveis. Recentemente, foi ainda demonstrado que a produção de ramnolipídeo por *P. aeruginosa*, desempenha um papel na tolerância do biofilme às células do sistema imune. Mais ainda, é sugerido que as células bacterianas no biofilme respondem à presença de PMN's (células polimorfonucleares) pela síntese de ramnolipídeo, que vai aderir às bactérias do biofilme e actuar como escudo e eliminar as células imunitárias após contacto. O sideróforo de ferro, a pioverdina, é necessário para a estruturação da matriz (Harmsen *et al.*, 2010). De acordo com Azambuja *et al.*, 2005, hipoteticamente, a pioverdina e piocianina actuam como potenciais citocinas contra parasitas do tracto digestivo. Uma das grandes vantagens para a população bacteriana é que a produção de compostos pelas bactérias vai-se acumular na matriz extracelular e ficar disponível para toda a comunidade (Harmsen *et al.*, 2010).

Como referido anteriormente, uma das mais importantes características dos biofilmes consiste na aquisição de tolerância, por parte da população bacteriana, a agentes antimicrobianos, antibióticos e componentes do sistema imunitário. Apesar dos agentes antimicrobianos diminuírem o número de bactérias presentes nos biofilmes, não

as elimina completamente o que pode ter como consequências recidivas de infecções bacterianas. As evidências disponíveis indicam que a matriz do biofilme, em geral, não inibe a difusão dos antibióticos, mas antes a penetração de alguns compostos parece ser retardada (Harmsen *et al.*, 2010). Enquanto que a maioria dos antibióticos é capaz de se difundir rapidamente pela matriz do biofilme de estirpes de *P. aeruginosa* wild-type, parece que o alginato produzido pelas estirpes mucoides pode retardar a difusão de alguns antimicrobianos (ex. piperacilina, amicacina e gentamicina). Outros antimicrobianos difundem-se rapidamente (ex. ciprofloxacina, levofloxacina, esparfloxacina e ofloxacina) (Harmsen *et al.*, 2010). Recentes evidências demonstraram que a actividade antibiótica sobre o biofilme de *P. aeruginosa* mucoide pode ser significativamente aumentada pela adição de liases de alginato. Estes dados sugerem que o alginato pode actuar como barreira aos antibióticos (Harmsen *et al.*, 2010).

Estudos efectuados com *P. aeruginosa*, indicam que a tolerância do biofilme é multifactorial e apenas uma combinação de diferentes mecanismos pode contribuir para os níveis de resistência observada pelas comunidades albergadas pelo biofilme (Drenkkard, 2003). Entre os mecanismos que contribuem para a tolerância encontram-se uma difusão antimicrobiana restrita, actividade fisiológica diferencial, indução de mecanismos de tolerância específicos e formação celular contínua (Harmsen *et al.*, 2010).

As diversas bactérias Gram-negativas frequentemente encontradas no intestino médio dos mosquitos, possivelmente influenciam especificamente o crescimento e desenvolvimento diferencial de *Plasmodium* ingerido com a refeição sanguínea. Esta contribuição para a modulação da competência vectorial ganha actualmente terreno no estabelecimento de novas estratégias de controlo do vector (Azambuja *et al.*, 2005).

Objectivo e Desenho Experimental

Objectivo

Este trabalho teve como objectivo geral o estudo da influência da flora bacteriana, nomeadamente as bactérias do género *Pseudomonas*, presentes no trato digestivo do mosquito *Anopheles* sp. e a sua relação com a infecção por *Plasmodium berghei*.

Desenho Experimental

Para se averiguar se a presença destas bactérias no intestino médio do mosquito confere algum grau de protecção à infecção, foi delineada a seguinte metodologia:

- A obtenção de mosquitos estéreis através de tratamento com antibióticos de largo espectro.
- A colonização do tubo digestivo dos mosquitos estéreis com dois isolados de *P. aeruginosa*, não mucosa e mucosa.
- O efeito da Microbiota na evolução da infecção por *P. berghei* em mosquitos, determinado através da prevalência e intensidade de infecção nas seguintes condições:
 - Flora bacteriana natural intacta
 - Condição de esterilidade
 - Presença de *P. aeruginosa* mucosa
 - Presença de *P. aeruginosa* não mucosa

Metodologia

Análise metagenómica de *Anopheles gambiae* infectados e não infectados com *Plasmodium falciparum*

No ano de 2005, foi realizado um estudo de metagenómica da Microbiota de mosquitos *A. gambiae* infectados e não infectados com *P. falciparum*. Este estudo foi realizado na empresa biotecnológica Biocant (Cantanhede, Portugal), utilizando amostras colectadas na Guiné Equatorial pela Dra. Cristina Mendes no âmbito de um projeto liderado pela Doutora Ana Paula Arez, e é referenciada a metodologia aplicada e resultados obtidos para comparação dos mesmos.

No estudo referido, fêmeas de mosquitos *A. gambiae* alimentadas, provenientes de duas regiões da Guiné Equatorial foram recolhidas de manhã no interior de habitações. Os mosquitos que se alimentaram durante a noite na habitação foram mantidos durante 8 dias para que se pudesse dar o desenvolvimento do parasita. Mosquitos com oocistos foram considerados susceptíveis e mosquito sem oocistos foram considerados resistentes. Mosquitos com parasitas nas glândulas salivares não foram considerados por representarem infecções adquiridas noutra local. O DNA destes mosquitos foi extraído e a presença de espécies de *Plasmodium* foi determinada por PCR (Mendes *et al.*, 2012). O DNA dos mosquitos com presença de oocistos foi agrupado em 3 pools infectados (susceptíveis à infecção) e 3 pools não-infectados (resistentes à infecção). Os pools de DNA foram processados por PCR. O DNA ribossomal 16S da comunidade bacteriana do intestino médio dos mosquitos foi amplificado para a região hipervariável V6 com primers de fusão contendo os códigos de barras, os adaptadores A e B Roche-454 Titanium e as sequências específicas para a região ribossomal. Os amplicões foram quantificados por fluorimetria com kit quantificação PicoGreen (Invitrogen) e agrupados em concentrações equimolares e sequenciados na direção A utilizando a plataforma GS 454 FLX Titanium, de acordo com as instruções do fabricante (Roche, 454 Life Ciências, Brandford, CT, EUA) no Biocant (Cantanhede, Portugal).

Os resultados da pirosequenciação foram processados usando um “pipeline” automático implementado no Biocant. Num primeiro passo, as leituras da sequenciação foram classificadas de acordo com o código de barras correspondente. De modo a

minimizar os erros aleatórios de sequenciação foram eliminadas as sequências com menos do que 120 pb e que continham mais do que dois nucleótidos indeterminados. As sequências com mais de 50% das regiões de baixa complexidade, determinada por DustMasker (Sogin *et al.*, 2006) e as sequências quiméricas, identificados por UChime (Edgar, 2011), foram descartados. As sequências foram agrupadas com USearch (Edgar, 2010) com uma distância filogenética de 3%, para criar as unidades taxonómicas operacionais (OTU). A taxonomia de cada OTU foi identificada através de uma pesquisa BLAST contra o Ribosomal Database project II (RDP) de banco de dados (Cole *et al.*, 2008). Todas as sequências com um alinhamento menor do que 40%, bem como aqueles com um valor de e maior do que $1e^{-50}$ foram rejeitados. Além disso, um teste de bootstrap foi aplicado aos OTUs para identificar o nível taxonómico. Apenas as sequências com um bootstrap superior a 70%, depois de 100 repetições, obtidas a partir de SeqBoot pelo pacote Phylip (Felsenstein, 1989), foram mantidas. A atribuição taxonómica das OTUs foi concluída com a atribuição do número de identificação taxonómica NCBI, o que permitiu a identificação de todos os organismos. Por fim, para cada um taxon identificado na amostra, o número total de sequências foi determinado, fornecendo a abundância de todos os organismos identificados, para análise estatística da população.

Determinação das curvas de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* dos isolados mucoso e não mucoso

As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de um doente com fibrose cística e foram cedidas pela Professora Isabel Sá-Correia do Centro de Engenharia Biológica e Química do Instituto Superior Técnico.

Os isolados de *P. aeruginosa* foram recebidos em placas de cultura, cultivados em meio específico para *Pseudomonas* (agar de citrimida). As colónias de bactérias isoladas foram retiradas com uma ansa e inoculadas em 2 ml de meio de cultura LB e incubadas durante a noite com agitação à temperatura ambiente ($\approx 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após 24

horas, e observando-se um claro crescimento bacteriano, a cada 500 µl desta suspensão adicionou-se 500 µl de glicerol e conservou-se a -80 °C até posterior utilização.

Para determinar a fase de crescimento exponencial, garantindo assim uma melhor taxa de divisão celular bacteriana, foram determinadas as curvas de crescimento dos isolados, mucoso e não mucoso, de *P. aeruginosa*. Para tal, adicionou-se 1 ml do extracto bacteriano, conservado em glicerol a -80 °C, a 7 ml de meio de cultura LB e determinou-se a absorvância num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 600 nm. Após a primeira leitura, deixou-se incubar a 30 °C com agitação e, a todas as horas procedeu-se à leitura dos valores de absorvância para cada intervalo de tempo.

Esterilização bacteriana e infecção de mosquitos *Anopheles stephensi*

Foi recolhido um total de 800 pupas de *A. stephensi*, que foram posteriormente distribuídas por 4 grupos com cerca 200 de pupas cada. As pupas correspondentes aos grupos 1, 2 e 3, foram colocadas a emergir em água autoclavada com uma mistura de 4 antibióticos: Ampicilina, Sulfato de Neomicina e Metronidazole numa concentração de 1g/L e Hidroclorato de Vancomicina a 0,5 g/L (Figura 7). As pupas correspondentes ao grupo 4 foram deixadas a emergir, noutra gaiola, em apenas água autoclavada.

Segundo Ivanov *et al.*, 2008 a Vancomicina ou Ampicilina inibem predominantemente bactérias Gram-positivas, o Metronidazole atua sobre as bactérias anaeróbicas e o Sulfato de Neomicina tem como alvo predominante as bactérias Gram-negativas.

Durante 3 dias, após a separação das pupas para as gaiolas de emergência, foi disponibilizada solução de sacarose estéril, numa concentração de 10 % e com a mistura dos 4 antibióticos, para os grupos 1, 2 e 3. Para o grupo 4 foi disponibilizada apenas solução de sacarose a 10 %. Procedeu-se ainda à mudança diária destas soluções.

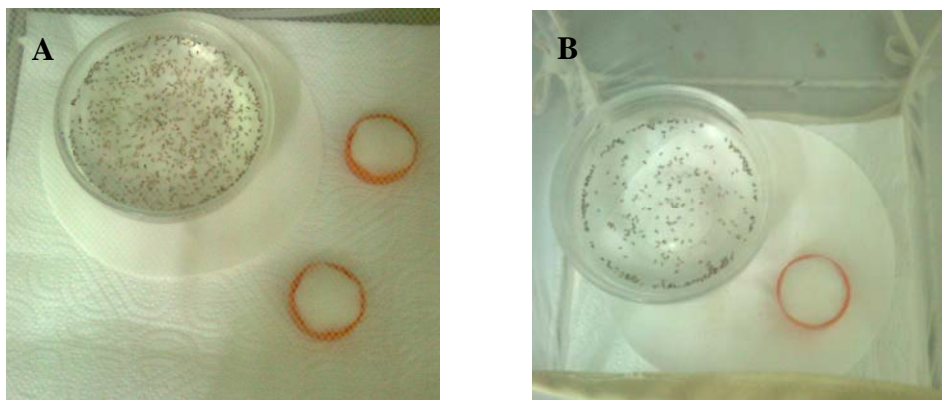


Figura 7. Pupas de *A. stephensi* colocadas a emergir na presença de antibióticos (A) e em água estéril (B).

De forma a garantir o máximo de esterilidade da fonte de açúcar e visto a impossibilidade de sujeitar esta molécula a elevadas temperaturas de forma a não perder as suas propriedades, a solução de sacarose, com e sem os antibióticos, foi preparada numa câmara de fluxo laminar com água Milli-Q esterilizada e passada por um filtro de 0,2 μm , para seringas.

Ao 4º dia, procedeu-se à distribuição/transferência dos mosquitos para 4 copos de papel descartável (Figura 8). Neste ensaio não foram utilizadas as gaiolas de rede convencionais para manter os mosquitos, devido ao tratamento dos mesmos com *Pseudomonas*, optando-se por utilizar material descartável e de fácil descontaminação.

Foi atribuída aos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, as designações de PaNM (tratamento antibiótico e reconstituição da Microbiota com *P. aeruginosa* não mucoso), PaM (tratamento antibiótico e reconstituição da Microbiota com *P. aeruginosa* mucoso), Antib (tratamento antibiótico sem reconstituição da Microbiota) e Cont (flora microbiana natural intacta).

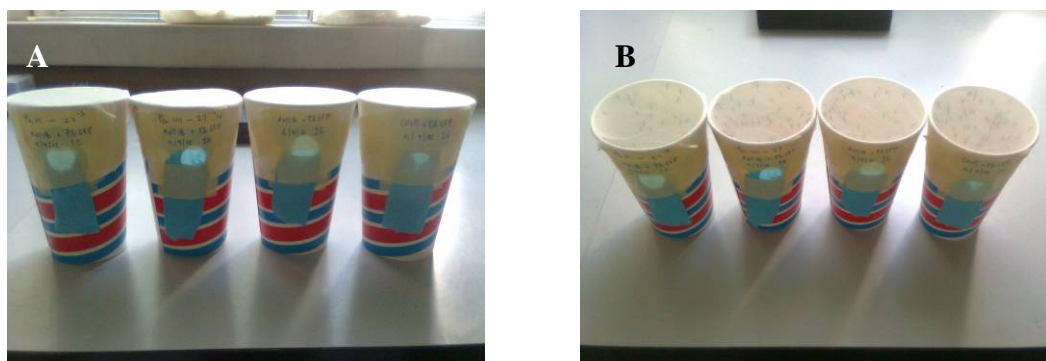


Figura 8. Copos descartáveis de papel, onde foram colocados os mosquitos, *A. stephensi*, correspondentes a cada grupo de cada experiência. A – Vista lateral e B – Vista superior.

Ainda no 4^a dia, foi retirada a fonte de açúcar aos mosquitos e procedeu-se à reconstituição da Microbiota dos grupos 1 e 2 com os isolados não mucoso e mucoso de *P. aeruginosa*. No dia anterior, deixou-se a incubar durante a noite os isolados de *Pseudomonas* em meio LB por aproximadamente 12 horas. Este intervalo de tempo, fundamental para a taxa de crescimento bacteriano alcançar a fase exponencial, foi determinado por espectrofotometria aquando da construção das curvas de crescimento.

Após a incubação e na fase exponencial do crescimento bacteriano, o algodão estéril foi embebido na suspensão bacteriana e colocado sobre as redes das estruturas onde os mosquitos se encontravam contidos. Para os mosquitos correspondentes ao grupo Cont (sem tratamento antibiótico nem *Pseudomonas*) e grupo Antib (com tratamento antibiótico mas sem as bactérias), colocou-se apenas algodão embebido em meio de cultura LB estéril (Figura 9).

Os algodões com meio de cultura, com e sem bactérias, foram disponibilizados aos mosquitos durante cerca de 24 horas e decorrido este intervalo de tempo foram retirados.

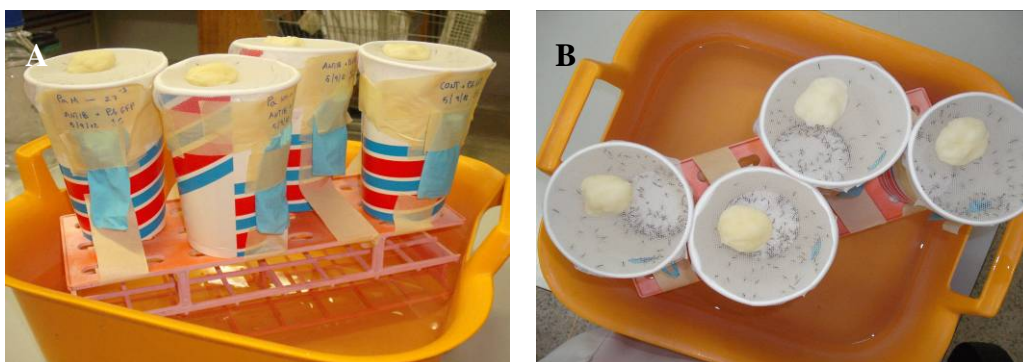


Figura 9. Copos de papel descartáveis com os grupos de mosquitos em estudo durante o tratamento com os isolados de *P. aeruginosa* em meio de cultura LB e em meio LB estéril. A – Vista lateral e B – Vista superior.

Infecção dos mosquitos com *Plasmodium berghei*

Ao quinto dia, após a emergência dos mosquitos adultos e após tratamento antibacteriano e reconstituição da flora bacteriana dos grupos respectivos, procedeu-se à infecção dos mosquitos com *P. berghei* GFP. Para isto, 7 dias antes da refeição sanguínea infectaram-se 2 murganhos (*Mus musculos*) CD₁ com uma ampola de sangue infectado com *P. berghei*. Após 4 dias determinaram-se as parasitêmias e procedeu-se novamente a uma passagem para 6 murganhos da estirpe CD₁. Efectuou-se uma punção cardíaca no murganho com a parasitemia entre 15 % a 20 % e infectaram-se novos murganhos por via intraperitoneal com o sangue infectado.

Três dias após a infecção dos 6 murganhos, coincidente com o 5^a dia dos mosquitos, determinaram-se as parasitêmias e observou-se a exflagelação, ou seja, a libertação dos gâmetas masculinos. Para a observação deste fenómeno, bafejou-se sobre uma gota de sangue fresco obtida da cauda do murganho. O aumento da taxa de CO₂ e consequente diminuição do pH é responsável por desencadear o processo de exflagelação dos microgametócitos. Seguidamente procedeu-se à refeição sanguínea dos mosquitos e infecção destes com *P. berghei*. Anestesiou-se 4 murganhos com 150 µl de uma mistura de 10 % Rompun (Bayer), 20 % Imalgene (Merial) em PBS por via intraperitoneal e aguardou-se alguns minutos até os murganhos perderem o reflexo de retirada da pata. Após este tempo, os murganhos foram colocados sob as redes dos

copos de papel descartáveis e as fêmeas de *A. stephensi* puderam alimentar-se durante 30-45 min.

Durante a alimentação das fêmeas, os copos foram cobertos com um pano escuro de forma a diminuir não só a intensidade luminosa, mas também a evitar a perda de calor por parte dos murganhos por acção do ar condicionado e baixas temperatura da sala, tornando os murganhos menos atractivos aos mosquitos. Temperaturas da ordem dos 21 °C estão associadas a uma melhor taxa de infecção por *P. berghei* no trato digestivo do mosquito.

Terminada a refeição sanguínea e retirando-se as fêmeas não alimentadas (não engorgitadas) restituiu-se a glucose, disponibilizando-a num algodão embebido sobre as redes e trocando-o diariamente. Os mosquitos foram mantidos durante 8 dias a 21 °C.

Isolamento de bactérias do intestino médio de *Anopheles stephensi*

A presença de *Pseudomonas* no intestino médio dos mosquitos foi avaliada após o tratamento com os antibióticos e reconstituição da Microbiota. Ao 5º dia, cerca de 24 horas após a reconstituição com *Pseudomonas* e antes da refeição sanguínea, 5 intestinos médios de fêmeas dos grupos PaNM, PaM, Antib e Cont foram extraídos e homogeneizados em PBS, em condições de esterilidade. Dos estratos obtidos, foram realizadas diluições sequenciais de 1/10, 1/100 e 1/1000. A partir destas diluições, 100 µl de cada, foram inoculadas em placas de cultura com os meios gerais LA e TSA e com o meio específico, agar de citrimida, para *Pseudomonas*. As placas foram deixadas a crescer numa estufa a 37 °C e foram observadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

Sabendo-se da existência de um incremento bacteriano cerca de 24 horas após a refeição sanguínea, o mesmo procedimento foi aplicado decorrido esse intervalo de tempo, após a refeição sanguínea.

Foi ainda inoculado em agar de citrimida, 100 µl de diluições de 1/100 e 1/1000, dos isolados mucoso e não mucoso a crescer em meio LB, aquando da sua utilização para infectar os mosquitos. Pretendeu-se de forma a confirmar o crescimento bacteriano dos dois isolados.

Contagem de oocistos

Oito dias após a refeição sanguínea dos mosquitos, procedeu-se à contagem dos oocistos a partir dos intestinos médios das fêmeas de *A. stephensi*. Para cada grupo em estudo, foram retiradas as fêmeas através de um aspirador entomológico e foram colocadas cerca de 30 segundos no congelador. Após os mosquitos se encontrarem inactivos pelo frio, procedeu-se à dissecação dos tubos digestivos. Após a obtenção dos intestinos médios, estes foram alinhados entre lâmina e lamela em PBS e observados ao microscópio de fluorescência. O número de oocistos foi determinado para cada intestino médio de cada fêmea, para cada grupo.

Os resultados relativos às taxas de infecção e contagem de oocistos, foram analisados estatisticamente de forma a compararem-se os diferentes grupos de tratamento em relação ao grupo controlo. Para tal, compararam-se as taxas de infecção dos mosquitos através de um teste de Fisher, bem como a intensidade de infecção, ou número de oocitos por estômago nas fêmeas infectadas, através de um teste de Mann-Whitney. A aplicação destes testes estatísticos permitiu determinar a existência ou não de diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Resultados

Análise metagenômica de *Anopheles gambiae* infectados e não infectados com *Plasmodium falciparum*

A partir do DNA extraído dos mosquitos infectados (susceptíveis à infecção) e não infectados (resistentes à infecção), foi amplificado e sequenciado o DNA da população microbiana presente no intestino médio dos mosquitos. As sequências obtidas foram analisadas para identificar alterações na diversidade e estrutura da comunidade bacteriana em mosquitos susceptíveis à infecção por *P. falciparum*, quando comparados com mosquitos resistentes à infecção. Foram obtidas um total de 60 037 sequências nas três réplicas de mosquitos analisados (28 005 infectados, 32 032 não infectados) e o número de sequências por amostra variou de 3 328 a 13 186.

Apenas foram considerados os grupos que estavam representados em todas as 3 réplicas. O género *Pseudomonas* (Tax ID:286) estava sub-representado nos mosquitos infectados, enquanto que a Classe *Gammaproteobacteria* (Tax ID:1236) estava sobre-representada (Figura 10).

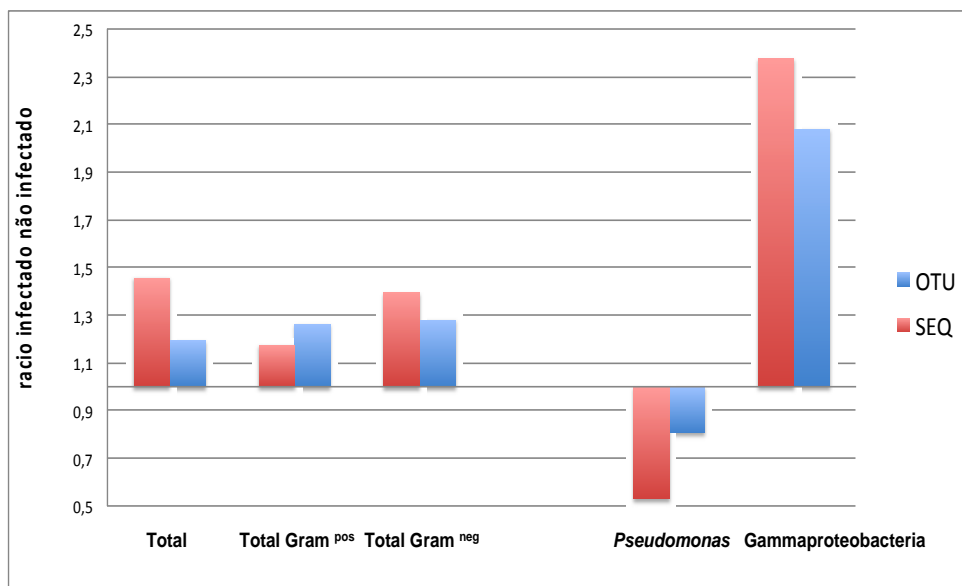


Figura 10. Alterações da Microbiota do intestino médio de mosquitos infectados por *P. falciparum*. As barras representam a relação entre a quantidade OTUs (Unidades taxonômicas operacionais) e do número de sequências por OTU observadas nos mosquitos infectados em relação aos mosquitos não infectados.

Curvas de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* dos isolados mucoso e não mucoso

De forma a determinar-se a fase de maior actividade celular das *Pseudomonas*, ou seja, o período correspondente à maior taxa de divisão bacteriana, a fase de crescimento exponencial ou fase Log, procedeu-se à determinação dos valores de absorvância a 600 nm, para cada intervalo de tempo, para os dois isolados (Anexo 1).

Os dois isolados, mucoso e não mucoso, apresentaram um crescimento idêntico, ou seja, revelaram valores de absorvância muito semelhantes. Em ambos, a fase exponencial teve início 6 horas após a inoculação do isolado em meio de cultura LB (Figura 11).

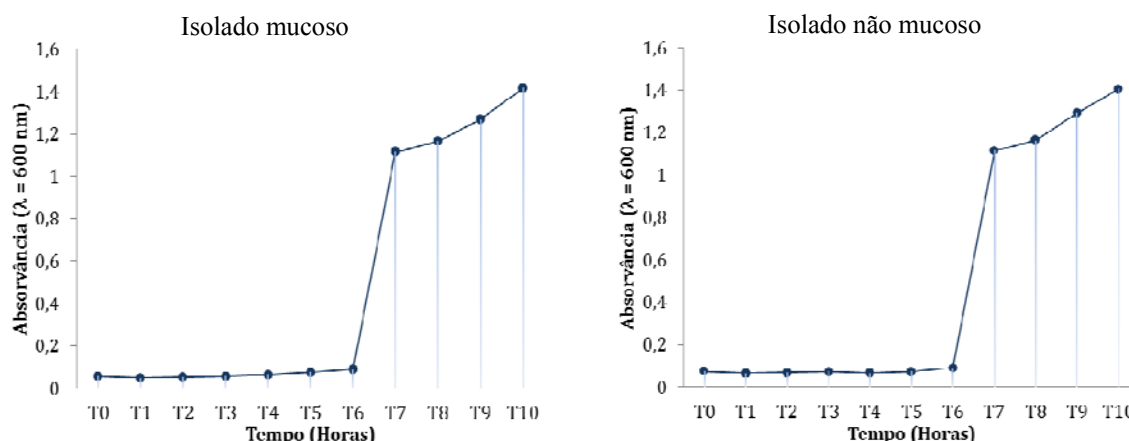


Figura 11. Valores de absorvância para o isolado mucoso e não mucoso de *P. aeruginosa*, para cada intervalo de tempo. Cada intervalo de tempo corresponde a 1 hora e os valores de absorvância foram medidos a um comprimento de onda de 600 nm.

A partir dos isolados utilizados para o crescimento bacteriano e determinação das curvas de crescimento, procedeu-se à sua inoculação em agar de citrimida com o objectivo de se confirmar o crescimento bacteriano de ambos. Efectuaram-se diluições de 1/100 e 1/1000, a partir das quais foram inoculados 100 µl de cada em meio de cultura LB, incubando-se posteriormente a 37 °C. Foram efectuadas observações decorridas 24, 48 e 72 horas.

A partir da observação do crescimento bacteriano, foram verificadas diferenças morfológicas nos diferentes isolados (figura 12). O crescimento bacteriano correspondente ao isolado não mucoso, demonstrou uma tendência de crescimento das colônias mais homogênea (placas da esquerda). Por sua vez, o isolado mucoso evidenciou a produção de alginato, típico destas colônias, mais acentuado com o decorrer do tempo e com a tendência para se acumular e escorrer (placas da direita).

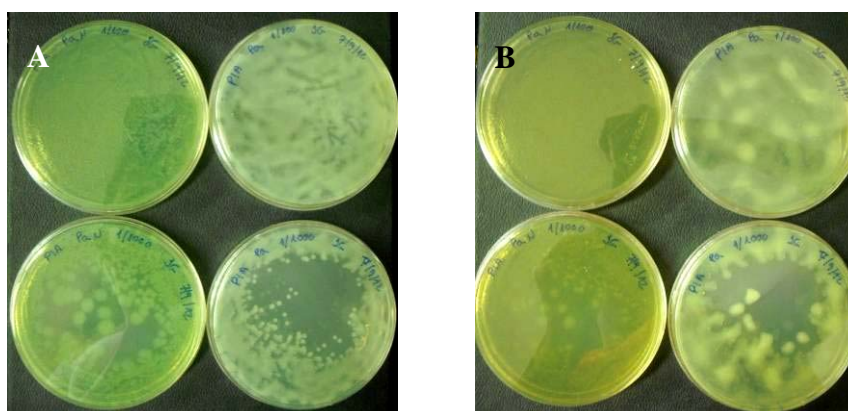


Figura 12. Crescimento bacteriano em meio de cultura de citrimida do isolado não mucoso (à esquerda) e mucoso (à direita) de *P. aeruginosa*. A - Após 24 horas de cultivo e B - Após 48 horas de cultivo.

Infecção dos mosquitos com *Plasmodium berghei*

Para se proceder à infecção experimental dos mosquitos de *A. stephensi* com *P. berghei*, foi necessário proceder-se à infecção dos murganhos CD₁, fonte do parasita aquando da refeição sanguínea dos mosquitos. As parasitémias foram determinadas por esfregaço sanguíneo, quatro dias após a infecção intraperitoneal com sangue infectado

Tabela I. Parasitémias dos murganhos 4 dias após a infecção por ampola e 3 dias após a passagem.

Murganho	Parasitémia (%)	
	Ampola	Passagem
1	19	21
2	22	20
3	-	18
4	-	21
5	-	<1
6	-	17

criopreservado, de dois murganhos (Nº 1 e 2) e três dias após passagem para quatro novos murganhos (Nº 3, 4, 5, e 6) (tabela I).

Todos os murganhos infectados, à excepção do Nº 5 posteriormente à passagem, apresentaram valores de parasitémia dentro do intervalo utilizado para a infecção dos mosquitos ($\approx 15-20\%$). Desta forma, para se efetuar a passagem a partir dos dois primeiros murganhos infectados, optou-se pelo Nº 2. Para a alimentação das fêmeas dos quatro grupos excluíram-se os murganhos 3 e 5, pois o primeiro pareceu apresentar uma menor taxa de exflagelação e o segundo apresentou uma parasitémia praticamente indetectável.

No dia da refeição sanguínea, foi observada uma mortalidade bastante elevada nos mosquitos correspondentes aos grupos sujeitos ao tratamento antibiótico, independentemente da presença de bactérias. No grupo controlo a mortalidade foi bastante reduzida.

Isolamento de bactérias do intestino médio de *Anopheles stephensi*

Para se confirmar a condição de esterilidade do tracto digestivo dos mosquitos após o tratamento antibiótico, procedeu-se ao isolamento bacteriano através do crescimento no meio de cultura geral LA e TSA. Pretendeu-se também a detecção de *P. aeruginosa*, após re-infecção dos mosquitos previamente esterilizados, através do crescimento bacteriano em meio de cultura à base de citrimida, específico para este grupo de bactérias.

Para cada grupo experimental, foram seleccionados aleatoriamente cinco mosquitos aos quais foram extraídos os intestinos médios e homogeneizados em PBS. A partir dos extractos obtidos, 100 μ l das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 foram cultivados nos meios de cultura seleccionados. Este procedimento foi aplicado 24 horas antes e após a refeição sanguínea. O crescimento bacteriano foi seguido 24, 48 e 72 horas após a inoculação e incubação a 37 °C (Anexo 2 e 3).

Previamente à refeição sanguínea, a partir da inoculação dos extractos dos intestinos médios dos mosquitos, cuja flora Microbiota foi restituída com as

Pseudomonas, foi observado crescimento bacteriano nos mosquitos do grupo PaNM para os diferentes meios de cultura. Contudo, na inoculação em agar de citrimida, foi apenas verificado crescimento bacteriano na diluição de 1/10. Morfologicamente, as colónias de *Pseudomonas* observadas apresentaram uma aparência de crescimento não mucoso, ou seja, não foi observada a produção de alginato. Este composto apresenta um aspecto de uma substância translúcida e viscosa em torno da colónia, que com o decorrer do tempo tem tendência para escorrer e acumular-se na fase oposta da placa de Petri. Para o grupo PaM, apenas foi verificado crescimento bacteriano quando semeado no meio de cultura LA e na diluição de 1/100.

Não foi observada qualquer colónia a partir da inoculação dos mosquitos tratados com os antibióticos, independentemente de meio de cultura e diluição efectuada. Por sua vez, para o grupo controlo, tecnicamente com a flora microbiana intacta, apenas foi observado o crescimento de colónias no meio de cultura LA e na diluição de 1/100.

Decorridas 24 após a refeição sanguínea, período correspondente a um aumento significativo quer na composição da flora microbiana intestinal dos mosquitos quer na quantidade, foi observado um acentuado crescimento bacteriano, em comparação com a fase anterior.

Para os mosquitos correspondentes aos grupos PaNM e PaM, foi observada uma elevada taxa de crescimento bacteriano nos meios de cultura LA e TSA, independentemente da diluição. Em relação ao meio de citrimida, foram observadas apenas colónias com aparência não mucosa na inoculação do grupo PaNM. Já no grupo PaM, foram verificadas diferenças morfológicas correspondentes ao crescimento dos dois tipos de isolado, mucoso e não mucoso.

Como esperado, não foi registado nenhuma evidência de crescimento bacteriano no grupo Antib. Contrariamente, no grupo Cont houve um crescimento bacteriano bastante acentuado para os meios de cultura LB e TSA. Em relação ao meio de citrimida, foi observado para este grupo a formação de colónias não mucosas e uma colónia mucosa, nas diluições 1/10 e 1/100. A partir destas placas de cultura, foram seleccionadas seis colónias não mucosas e uma colónia mucosa, todas bem diferenciadas e distintas, e foram retiradas com uma ansa e colocadas a crescer em meio

LB durante a noite. Foram realizadas alíquotas destas suspensões bacterianas e conservadas com glicerol a -80 °C para posterior análise molecular.

A tabela II sumariza o crescimento bacteriano de cada grupo, para cada meio de cultura e diluição.

Tabela II. Presença/ausência de crescimento bacteriano dos extractos intestinais dos mosquitos, 24 horas antes e após a refeição sanguínea, decorridas 24 e 48 horas após incubação a 37 °C, em relação a cada grupo de estudo e diluição.

		Meio de Cultura						
		LA		TSA		Citrimida		
		Diluição	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H
PaNM	24h antes RF	1/10	+	+	+	+	+	+
		1/100	+	+	+	+	-	-
		1/1000	+	+	+	+	-	-
	24h após RF	1/10	+	+	+	+	+	+
		1/100	+	+	+	+	+	+
		1/1000	+	+	+	+	+	+
PaM	24h antes RF	1/10	-	-	-	-	-	-
		1/100	+	+	-	-	-	-
		1/1000	-	-	-	-	-	-
	24h após RF	1/10	+	+	+	+	+	+
		1/100	+	+	+	+	+	+
		1/1000	+	+	+	+	+	+
Antib	24h antes RF	1/10	-	-	-	-	-	-
		1/100	-	-	-	-	-	-
		1/1000	-	-	-	-	-	-
	24h após RF	1/10	-	-	-	-	-	-
		1/100	-	-	-	-	-	-
		1/1000	-	-	-	-	-	-
Cont	24h antes RF	1/10	-	-	-	-	-	-
		1/100	+	+	-	-	-	-
		1/1000	-	-	-	-	-	-
	24h após RF	1/10	+	+	+	+	+	+
		1/100	+	+	+	+	+	+
		1/1000	+	+	+	+	-	-

Contagem de oocistos

Para a determinação da taxa e intensidade de infecção dos mosquitos, foi dissecado o intestino médio que se observou ao microscópio de fluorescência. O

número de oocistos foi contado e registado para cada mosquito em cada grupo (anexo 4, 5, 6 e 7), no entanto, devido à elevada mortalidade nos mosquitos sujeitos ao tratamento antibiótico, ao 8º dia os diferentes grupos apresentaram uma grande variação no número de indivíduos. Para os grupos tratados com os antibióticos e re-colonizados com os isolados não mucoso e mucoso de *P. aeruginosa* e para o grupo sem re-colonização, foi apenas possível dissecar um total de 10, 21 e 17 mosquitos, respectivamente. Para o grupo controlo, foi possível dissecar um total de 40 mosquitos.

Em relação ao número de oocistos no intestino médio de cada mosquito para cada grupo, foram determinados os valores médios da taxa de infecção (tabela III e figura 13).

Tabela III. Nº de mosquitos infectados com *P. berghei* e não infectados para cada grupo de estudo e respectivas percentagens.

	Grupos mosquitos (%)				Total
	Pa NM	PaM	Antib	Cont	
Infectados	8 (20 %)	10 (47,6 %)	10 (58,8 %)	25 (62,5 %)	53
Não Infectados	2 (80 %)	11 (52,4 %)	7 (41,2 %)	15 (37,5 %)	35
Total	10	21	17	40	88

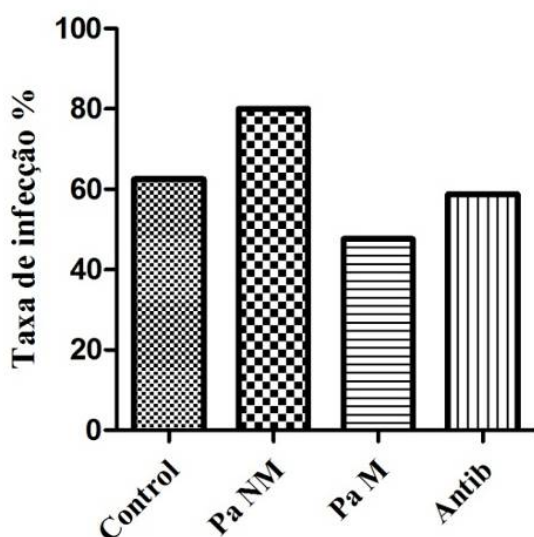


Figura 13. Taxa de infecção para cada grupo de mosquitos

O grupo PaM (restituição da flora Microbiota com *P. aeruginosa* mucosa) apresentou a menor taxa de infecção. O grupo PaNM (restituição da flora Microbiota com *P. aeruginosa* não mucosa) apresentou a maior taxa de infecção e o grupo Antib apresentou uma taxa de infecção semelhante ao grupo Cont. Contudo, estes resultados não apresentaram diferenças significativas $p=0,1991$, $p=0,2567$ e $p=0,5108$, respectivamente quando comparadas com o teste exato de Fisher.

Para o estudo da intensidade da infecção, foi possível verificar que o grupo Antib (p=0,1751), apresentou uma intensidade de infecção mais elevada, ou seja, apresentou um maior número de oocistos, por intestino médio infectado. O grupo PaM (p=0,2101), que além de apresentar a menor taxa de infecção, apresentou ainda a menor intensidade de infecção. Por fim, o grupo PaNM (p=0,5444) apresentou uma intensidade de infecção intermédia, em relação aos grupos anteriores, mas superior ao grupo Cont (figura 14). Estes resultados não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o teste de Mann-Whitney.

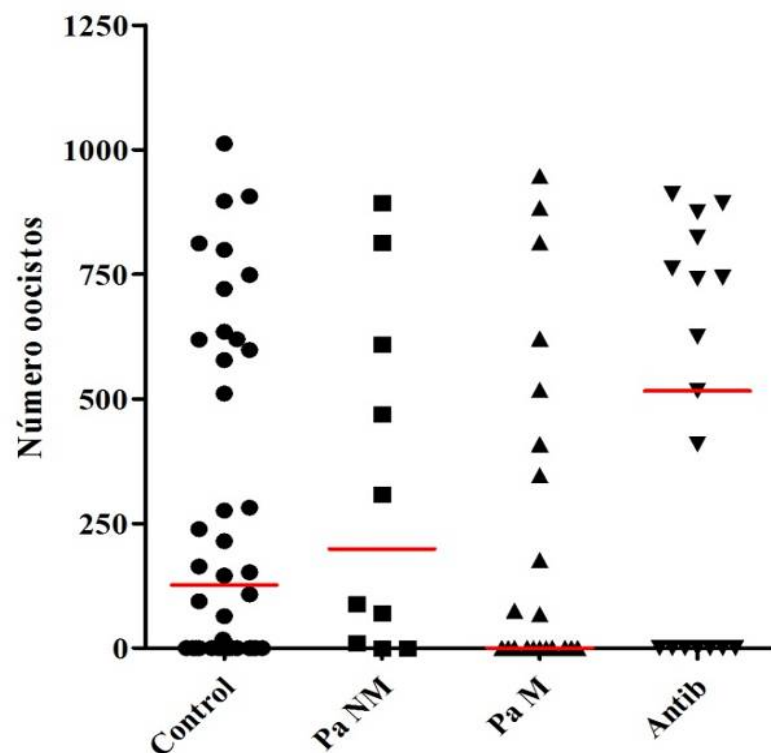


Figura 14. Intensidade de infecção para cada grupo de estudo. Control, sem tratamento com antibiótico; PaNM, tratamento com antibiótico e recolonização do intestino médio com *P. aeruginosa* nao-mucosa; PaM; tratamento com antibiótico e recolonização do intestino médio com *P. aeruginosa* mucosa; tratamento com antibiótico sem recolonização do intestino médio.

Discussão dos Resultados / Conclusões

Ao longo da evolução da Classe *Insecta*, as bactérias foram e continuam a ser uma força constante e dominante no meio ambiente. O sucesso dos insectos criou uma diversidade de oportunidades para os microrganismos ocuparem uma variedade de nichos ecológicos criados pelos insectos. O intestino médio dos representantes desta classe é um exemplo clássico de nichos onde os hospedeiros obtêm vantagens (Dillon & Dillon, 2004).

De um modo geral, o conhecimento das comunidades residentes no tracto digestivo dos insectos continua por explorar, principalmente devido às limitações das técnicas de isolamento baseadas em culturas e devido à baixa resolução de técnicas de análise como *fingerprint*. Contudo, com a nova geração de métodos de sequenciação de DNA está-se a providenciar novas oportunidades para explorar a diversidade bacteriana nos ambientes complexos, assim como aprofundar conhecimento sobre a susceptibilidade à doença e interações hospedeiro/agente patogénico (Boissière *et al.*, 2012).

Na primeira fase deste trabalho, procedeu-se ao crescimento bacteriano dos dois isolados de *P. aeruginosa*, produtor de biofilme e não produtor. Deste procedimento, foi possível determinar que a fase Log teve início, aproximadamente, 6 horas após a incubação bacteriana nas condições descritas anteriormente. O crescimento dos dois isolados apresentou valores de absorvância bastante semelhantes para cada intervalo de tempo, incluindo o início da fase exponencial após o mesmo espaço de tempo. Este ensaio terminou ao fim de 10 horas, não tendo sido possível alcançar a fase estacionária, por isso, optou-se por assumir 12 horas como tempo ideal para o qual as bactérias encontrar-se-iam metabolicamente mais activas.

A partir da inoculação destes isolados, após 12 horas de incubação, observou-se em agar de citrimida o crescimento bacteriano ao fim de 24 e 48 horas. Aqui, foi possível observar claras diferenças morfológicas entre os isolados mucoso e não mucoso, nomeadamente no isolado produtor de alginato, onde foi possível observar a formação do biofilme. Com o decorrer do tempo, as colónias foram-se alastrando e a formação do biofilme demonstrou uma tendência para cobrir toda a superfície da placa, chegando a escorrer e acumular-se na extremidade oposta da placa.

Durante o processo de expansão do biofilme, células microbianas de *P. aeruginosa* vão-se libertar das microcolónias e alcançar novas áreas da superfície ou então bactérias isoladas vão-se deslocar através de flagelos. Quando a fonte de carbono utilizada para o crescimento bacteriano é a glucose, as bactérias aderentes a uma superfície vão-se diferenciar inicialmente em subpopulações não móveis e móveis. As primeiras vão formar uma espécie de “talos” de uma estrutura multicelular semelhante a “cogumelos”, onde as subpopulações móveis vão colonizar os “talos” e subsequentemente vão formar a parte superior da estrutura. Quando o citrato é utilizado como fonte de carbono, a totalidade da população bacteriana é móvel na fase inicial de formação do biofilme e não se formam estruturas semelhantes a “cogumelos”, mas antes um biofilme plano e contínuo (Harmsen *et al.*, 2010).

Previamente à colonização do tubo digestivo dos mosquitos com *Pseudomonas*, mucoide e não mucoide, procedeu-se à sua esterilização bacteriana nos grupos PaNM, PaM e Antib. No fim deste procedimento, foram cedidas as bactérias em meio de cultura LB aos dois primeiros grupos e apenas meio LB estéril ao grupo Antib. Foi verificada uma mortalidade bastante significativa nos mosquitos tratados com os antibióticos seleccionados. Devido a esta redução bastante acentuada dos grupos sujeitos ao tratamento antibiótico, em relação ao grupo controlo, não foi possível retirar conclusões concretas.

De acordo com Dillon & Dillon, 2004, a utilização de agentes antimicrobianos para suprimir a flora bacteriana intestinal dos insectos tem as suas contrapartidas, além do efeito tóxico sobre o hospedeiro, microrganismos resistentes podem superar o efeito antibacteriano. Em estudos com determinadas espécies de gafanhotos, esta desvantagem foi ultrapassada simplesmente pela esterilização da superfície dos ovos e mantendo a descendência em condições de esterilidade e isolamento. Também Lyke *et al.*, 2010 no seu trabalho com um isolado de *P. falciparum* resistente à cloroquina obteve mosquitos *A. stephensi* assépticos através de desinfecção dos ovos e controlo do desenvolvimento em condições de esterilidade.

Em trabalhos realizados com *A. gambiae*, Dong *et al.*, 2009 esterilizou mosquitos com Gentamicina 15 mg/ml e Estreptomicina/Penicilina 10 mg/ml. Nestes estudos verificou-se uma elevada mortalidade, até 7 dias após a infecção com *P.*

berghei, aproximadamente 60 % em mosquitos sépticos e 40 % em assépticos. Contudo, estes resultados sugerem que a longevidade de *Anopheles*, após a infecção por *Plasmodium*, é influenciada pela presença da Microbiota, uma vez não há diferenças significativas na mortalidade dos mosquitos após uma refeição sanguínea não infectada, o aumento da mortalidade resulta assim, da ocorrência simultânea de bactérias e *Plasmodium*. Também Noden *et al.*, 2011 utilizou diferentes concentrações de gentamicina para analisar o seu efeito antibiótico sobre isolados bacterianos provenientes do intestino médio de mosquitos *A. gambiae*. Este autor obteve ainda mosquitos estéreis através de um tratamento de três dias com uma solução de 10 % de sacarose com uma concentração de 50 µg/ml do antibiótico.

Mosquitos adultos criados em laboratório, alimentados com bactérias Gram-negativas juntamente com gametócitos de *P. falciparum*, demonstraram que todas as bactérias deste grupo inibiram total ou parcialmente o desenvolvimento de oocistos. O mesmo resultado não foi demonstrado com bactérias Gram-positivas. Da mesma forma, alimentando os mosquitos com gentamicina aumentou significativamente o número de mosquito infectados com *Plasmodium* (Azambuja *et al.*, 2005).

Seguindo a selecção de antibióticos proposta por Ivanov *et al.*, 2008, para a eliminação da flora microbiana, foi possível obter mosquitos estéreis, ou pelo menos sem microrganismos capazes de crescer nos meios de cultura seleccionados, antes e após a refeição sanguínea. Para os mosquitos tratados com os antibióticos, mas re-infectados com as *Pseudomonas*, foi observado crescimento bacteriano, de um modo geral, nos meios de cultura LA e TSA. No meio de citrimida, específico para este grupo de bactérias, foi observado apenas crescimento para o isolado não mucoso. Após a refeição sanguínea, o crescimento bacteriano foi bastante acentuado para os meios de cultura LA e TSA, para o meio de citrimida verificou-se crescimento para o isolado mucoso, onde foi possível observar-se o desenvolvimento de colónias produtoras de muco e não mucosas, com a respectiva pigmentação característica associada a este meio de cultura. Posteriormente à ingestão de sangue por fêmeas hematófagas, assiste-se a uma expansão bacteriana massiva no intestino médio dos mosquitos, provavelmente devido à acumulação de nutrientes resultantes da digestão do sangue (Pumpuni *et al.*, 1996).

Com este trabalho, devido à exacerbada mortalidade dos mosquitos tratados com os antibióticos, não foi possível obter diferenças significativas relativas à taxa de infecção entre os diferentes grupos em relação ao grupo controlo. O entanto, a maior taxa de infecção foi verificada no grupo cuja flora Microbiota foi restabelecida com *P. aeruginosa* do isolado não mucoso, já a menor taxa de infecção foi apresentada pelo grupo de mosquitos tratados com o isolado mucoso.

Após o estabelecimento da infecção, foi analisada a intensidade da mesma, ou seja, o número de oocistos por intestino médio. O grupo sujeito ao tratamento antibiótico, mas sem restituição de flora Microbiota, exibiu a maior proporção de oocistos por fêmea infectada. Além de apresentar a menor taxa de infecção, o grupo PaM apresentou a menor intensidade de infecção. Em relação ao grupo Cont e Antib, apesar de não apresentarem taxas de infecção muito diferentes, superior no primeiro, a intensidade de infecção foi bastante superior no grupo esterilizado.

Podemos afirmar com estes resultados, que após o estabelecimento da infecção no hospedeiro vector, existe uma relação entre o desenvolvimento inicial da infecção e a presença de flora bacteriana do tracto digestivo. Determinadas espécies bacterianas poderão modificar o ambiente do intestino médio dos mosquitos e torná-lo menos propício ou favorável ao desenvolvimento parasitário. Também, elevadas concentrações bacterianas, nomeadamente a expansão bacteriana após a refeição sanguínea, podem evocar uma resposta imunitária que posteriormente bloqueia o desenvolvimento do parasita (Pumpuni *et al.*, 1996).

Também, relativamente ao grupo das *Pseudomonas*, o isolado produtor de alginato demonstrou de alguma forma e numa primeira análise, conferir algum grau de protecção não só relativamente ao estabelecimento da infecção por *P. berghei*, mas também no número de oocistos observáveis no intestino médio após a infecção, actuando, possivelmente, na capacidade dos oocinetos atravessarem a parede do intestino. Noden *et al.*, 2011 afirma que biofilmes bacterianos têm demonstrado a capacidade de aderir e inibir crescimento de outros protozoários *in vitro*, no caso particular de *Plasmodium*, possivelmente encontrar-se-á associado à diminuição da mobilidade dos oocinetos.

No estudo metagenómico efectuado, as sequências da região hipervariável V6 do 16S rRNA bacteriano foram analisadas para identificar alterações na diversidade e estrutura da comunidade bacteriana em mosquitos susceptíveis à infecção por *P. falciparum*, quando comparados com mosquitos resistentes à infecção. A presença de uma maior quantidade relativa de bactérias do género *Pseudomonas* parece estar associada aos mosquitos não infectados, sugerindo que poderá conferir alguma protecção ao mosquito *A. gambiae* contra a infecção por *P. falciparum*. No entanto, com o trabalho actual, a quebra no número de mosquitos tratados com antibióticos impediu a formulação de conclusões concretas.

Contudo, estes resultados preliminares não permitem tirar conclusões concretas, nomeadamente devido à ausência de significância, possivelmente associada às diferenças no número de mosquitos de cada grupo, especialmente considerando o baixo número de mosquitos nos grupos tratados. Também, a elevada mortalidade nos grupos sujeitos à esterilização bacteriana, de alguma forma poderá ter seleccionado os mosquitos mais resistentes por grupo tratado, e estes não serem representativos da população em geral. Desta forma, torna-se fundamental a repetição deste ensaio de forma a não só confirmar os resultados como aumentar a robustez estatística.

Recentes investigações com mosquitos sugerem a existência de uma ligação entre a redução da taxa de bactérias no tracto digestivo e um aumento da produção de oocistos de *Plasmodium*. De acordo com Dillon & Dillon, 2004, a prevalência de determinados tipos de bactérias no intestino médio dos mosquitos, pode influenciar o desenvolvimento de *Plasmodium* face a variações no seu habitat.

As bactérias no lúmen do intestino médio dos mosquitos podem interagir directamente e produzir um efeito adverso nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Plasmodium* após a refeição sanguínea. Este efeito pode ser resultado de diversos factores, tais como a produção de várias enzimas ou toxinas e a presença de barreiras físicas que impedem o contacto entre os oocinetos de *Plasmodium* e o epitélio do tracto digestivo. Alternativamente, o efeito bacteriano no desenvolvimento do parasita, pode ocorrer indirectamente através de alterações na fisiologia do próprio hospedeiro. Possivelmente, este efeito resulta da indução de respostas imunitárias cruzadas entre as bactérias e os parasitas de malária (Dong *et al.*, 2009). Mais ainda, após uma refeição

sanguínea, as populações bacterianas no intestino médio dos mosquitos sofrem uma expansão massiva, o que poderá também resultar numa sobreactivação do sistema imunitário do hospedeiro (Azambuja *et al.*, 2005).

Alterações no metabolismo do hospedeiro poderão também afectar a composição de moléculas derivadas do mosquito, essenciais para o desenvolvimento de *Plasmodium*. Alguns estudos sugerem, que factores imunes do mosquito induzidos pela presença das bactérias, estão associados na eliminação de parasitas na fase do desenvolvimento de pré-oocisto (Dong *et al.*, 2009). Existem evidências consideráveis que o intestino médio dos insectos vectores é um órgão imunoreactivo, capaz de responder à presença de bactérias e parasitas ingeridos com a refeição sanguínea, pela regulação de genes específicos e síntese de péptidos antimicrobianos (Azambuja *et al.*, 2005).

De facto, em termos funcionais, tem sido observada uma sobreposição de respostas imunes anti-bacterianas e anti-*Plasmodium*, sugerindo que os mosquitos carecem de mecanismos de defesa específicos contra parasitas de malária, mas recorrem aos mecanismos anti-bacterianos para limitar as infecções por *Plasmodium*. Assim, surge como hipótese que a presença das bactérias é responsável pela activação de respostas imunitárias antimicrobianas e consequentemente, a síntese de péptidos antimicrobianos e outros factores imunes que irão actuar contra coinfeção com *Plasmodium* (Dong *et al.*, 2009). Ou seja, tem sido demonstrado que a flora microbiana do tubo digestivo do mosquito é capaz de estimular a actividade imune basal, que por sua vez actua contra o parasita da malária (Cirimotich *et al.*, 2011a).

A massiva quantidade de bactérias presentes no intestino médio após uma refeição sanguínea pode também resultar na produção de factores responsáveis pela inibição da adesão ou desenvolvimento dos parasitas. Tais factores podem incluir pigmentos como a prodigiosina, produzida pelas bactérias Gram-negativas *Serratia marcescens*, *S. plymuthica*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp e *Enterobacter*, ou moléculas tóxicas com potencial actividade antiparasitária, como os sideróforos pioverdina e piocianina (Azambuja *et al.*, 2005).

Boissière *et al.*, 2012 afirma que o papel protector da flora microbiana do tracto digestivo de *Anopheles* contra a coinfeção com parasitas de malária, pode ser

demonstrado através de tratamento antibiótico para suprimir as bactérias, que resulta num aumento das infecções por *Plasmodium*. Desta forma, coinfeções de bactéria e *Plasmodium* reduzem o número de oocistos em desenvolvimento no intestino médio do mosquito, quer em condições laboratoriais quer em condições de campo. Numerosos estudos demonstram que as bactérias da flora microbiana actuam sobre a capacidade de *Plasmodium* se diferenciar em oocisto no intestino médio de *Anopheles*. Mosquitos que foram tratados com antibióticos para remover as bactérias do tubo digestivo, são mais susceptíveis a infecções por *Plasmodium* e a reconstituição da flora microbiana destes mesmos mosquitos, resulta em infecções do mesmo nível de mosquitos não tratados (Cirimotich *et al.*, 2011a).

A capacidade vectorial das espécies de insectos hematófagos está directamente associada aos seus hábitos de ingestão de sangue. A digestão da hemoglobina, a principal proteína do sangue, no tubo digestivo destes insectos resulta na libertação de grandes quantidades do grupo prostético heme, com um potencial pro-oxidante e efeito citotóxico quando não ligado a proteínas. Diversos mecanismos de protecção contra o stress oxidativo provocado pelo grupo heme e as espécies reactivas do oxigénio (ROS), evoluíram com as diferentes espécies de insectos hematófagos (Oliveira *et al.*, 2011).

Estudos realizados com *Enterobacter bacterium* isolada em mosquitos selvagens capturados na Zâmbia, demonstraram que esta bactéria confere resistência a infecções por *P. falciparum*. Em vez de induzir respostas imunes que levam a uma diminuição da carga parasitária, estas experiências revelaram que a inibição no desenvolvimento de *Plasmodium* na presença da flora Microbiota comensal, resulta da produção de ROS por bactérias do grupo *Enterobacter*. Este stress oxidativo vai actuar directamente sobre os parasitas do intestino médio do mosquito (Boissière *et al.*, 2012).

Em estudos com *Aedes aegypti*, foi também demonstrado que imediatamente após a ingestão de sangue diminui a taxa de ROS no tracto digestivo destes insectos. Este evento, que ocorre em paralelo com a expansão da flora microbiana, permite concluir que as ROS estão relacionadas com o controlo bacteriano no tracto digestivo destes insectos. É ainda demonstrado que a ausência de ROS diminui a resistência dos mosquitos à infecção e aumenta a sua mortalidade. Um outro exemplo, refere-se a uma estirpe de *A. gambiae*, refratária à infecção por *Plasmodium*, vive num estágio crónico

de stress oxidativo, esta situação permite o crescimento bacteriano que antagoniza a infecção pelo parasita (Oliveira *et al.*, 2011). Segundo Cirimotich *et al.*, 2011b, foi recentemente identificada uma estirpe de *Enterobacter* a partir de mosquitos selvagens, que produz espécies reactivas de oxigénio que elimina os parasitas em desenvolvimento no tubo digestivo inibindo a infecção por *Plasmodium* antes da formação do oocisto.

A constituição simples, quando comparada com os mamíferos, da flora microbiana dos mosquitos torna-os um bom modelo tentar compreender a dinâmica entre o sistema imune do hospedeiro, a flora Microbiota e a invasão por agentes patogénicos. Uma melhor compreensão do papel da flora microbiana face ao sistema de defesa do hospedeiro irá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo da transmissão da malária (Dong *et al.*, 2009). Formulações bacterianas são actualmente utilizadas como biocontrolo de larvas de mosquito, no entanto devido à natureza das interacções mosquito-bactéria ainda não totalmente esclarecidas, a elaboração de procedimentos susceptíveis de aplicar à população adulta continua por resolver (Cirimotich *et al.*, 2011a).

Referências Bibliográficas

- Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 63 195-221.
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Gut Microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology.* 2005; 21 12.
- Baton AL & Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *TRENDS in parasitology.* 2005; 21(21) 573-580.
- Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS Pathogens.* 2010; 8(5) e1002742.
- Cirimotich CM, Clayton AM, Dimopoulos G. Low- and High-Tech Approaches to Control *Plasmodium* Parasite Transmission by *Anopheles* Mosquitoes. *Journal of Tropical Medicine.* 2011a; 891342.
- Cirimotich_CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G. Natural Microbe-Mediated Refractoriness to *Plasmodium* Infection in *Anopheles gambiae*. *SCIENCE.* 2011b; 332 855-858.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research.* 2008; 37(Database issue) D141-D145.

- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, Capone A, Ulissi U, Epis S, Genchi M, Sagnon N, Faye I, Kang A, Chouaia B, Whitehorn C, Moussa GW, Mandrioli M, Esposito F, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G. Mosquito-Bacteria Symbiosis: The Case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. HOST MICROBE INTERACTIONS. 2009; 60 644-654.
- Dillon RJ & Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annu. Rev. Entomol. 2004; 49 71–92.
- Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* Immune Responses to Human and Rodent *Plasmodium* Parasite Species. PLoS Pathogens. 2006a; 2(6) e52
- Dong Y & Dimopoulos G. *Anopheles* Fibrinogen-related Proteins Provide Expanded Pattern Recognition Capacity against Bacteria and Malaria Parasites. The journal of biological chemistry. 2009; 284(15) 9835-9844.
- Dong Y, Harry ET, Dimopoulos G. AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System. PLoS BIOLOGY. 2006b; 4(7) e229.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. PLoS Pathogens. 2009; 5(5) e1000423.
- Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes and Infection. 2003; 5 1213–1219.

- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, Rizzi A, Urso R, Brusetti L, Borin S, Mora D, Scupp P, Pasqualin L, Clementi E, Genchi M, Corona S, Negri I, Grandi G, Alma A, Kramer L, Esposito F, Band C, Sacchi L, Daffonchio D. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. PNAS. 2007; 104(21) 9047-9051.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics. 1989; 5 164-166.
- Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010; 59 253–268.
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics. 2010; 26(19) 2460-2461.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics. 2011; 27 2194-2200.
- Herrera-Ortiz A, Martínez-Barnette J, Smit N, Rodriguez MH, Lanz-Mendoza H. The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. Developmental and Comparative Immunology. 2011; 35 44–50.
- Ivanov II, Frutos RF, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. Cell Host & Microbe. 2008; 4 337–349.

- Kelly-Hope LA & McKenzie FE. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malaria Journal*. 2009; 8(19) 10.1186/1475-2875-8-19.
- Lyke KL, Laurens M, Matthew Adams M, Billingsley PF, Richman A, Loyevsky M, Chakravarty S, Plowe CV, Sim BKL, Edelman R, Hoffman SL. *Plasmodium falciparum* Malaria Challenge by the Bite of Aseptic *Anopheles stephensi* Mosquitoes: Results of a Randomized Infectivity Trial. *PLoS ONE*. 2010; 5(10) e13490.
- Lau AOT, Sacci Jr JB, Azad AF. Retrieving parasite specific liver stage gene products in *Plasmodium yoelii* infected livers using differential display. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000; 111 143-151.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathogens* 2009; 5(3) e1000354.
- Ma L, Wang s, Wang D, Parsek NR, Wozniak DJ. The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 65 377-380.
- Mann EE & Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36 893-916.
- Meister S, Agianian B., Turlure F, Relógio A, Morlais I, Kafatos FC, Christophides GK. *Anopheles gambiae* PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. *PLoS Pathogens*. 2009; 5(8) e1000542.

- Mendes AM, Awono-Ambene PH, Sandrine E. Nsango, Anna Cohuet A, Fontenille D, Kafatos FC, Christophides GK, Morlais I, Vlachou D. Infection Intensity-Dependent Responses of *Anopheles gambiae* to the African Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*. 2011; 79(11) 4708-4715.
- Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, Sousa B, Rosário VE, Benito A, Berzosa P, Arez AP. Duffy Negative Antigen Is No Longer a Barrier to *Plasmodium vivax* – Molecular Evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6): e1192.
- Mitri C, Jacques JC, Thierry I, Riehle MM, Xu J, Bischoff E, Morlais I, Nsango SE, Vernick KD, Bourgouin C. Fine Pathogen Discrimination within the APL1 Gene Family Protects *Anopheles gambiae* against Human and Rodent Malaria Species. *PLoS Pathogens*. 2009; 5(9) e1000576.
- Mitri C & Vernick KD. *Anopheles gambiae* pathogen susceptibility: the intersection of genetics, immunity and ecology. *Current Opinion in Microbiology*. 2012; 15 1-7.
- Noden BH, Vaughan JA, Pumpuni CB, Beier JC. Mosquito ingestion of antibodies against mosquito midgut Microbiota improves conversion of ookinetes to oocysts for *Plasmodium falciparum*, but not *P. yoelii*. *Parasitology International*. 2011; 60(4) 440-446.
- Oliveira JHM, Gonçalves RLS, Lara FA, Dias FA, Gandara ACP, Menna-Barreto RFM, Edwards MC, Laurindo FRM, Silva-Neto MAC, Sorgine MHF, Oliveira PL. Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota. *PLoS Pathogens*. 2011; 7 (3) e1001320.

- Pumpuni CB, Demaio J, Kent M, Davis JR, Beeier JC. Bacterial population dynamics in three anopheline species: The impact on *Plasmodium* sporogonic development. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1996; 54(2) 214-218.
- Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* - an Asian malarial vector. BMC Microbiology. 2009; 9 96 1471-2180-9-96.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. Cell. 2004; 118 229-241.
- Riehle MA & Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2005; 35 699-707
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". PNAS; 2006; 103(32) 12115-12120.
- Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. TRENDS in Microbiology. 2001; 9(5) 222-227.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Distribuição mundial da malária, com referência às zonas em fase de eliminação da transmissão e zonas de controlo da infecção. Adaptado de: <http://www.talkafrique.com/issues/eradicating-malaria-not-anytime-soon>.

Figura 2. Efeito de Bottleneck, onde se observa uma redução significativa do número de oocistos no intestino médio de *Anopheles*. Adaptado de: <http://kafatos.openwetware.org/Research.html>.

Figura 3. Desenvolvimento de *Plasmodium* no intestino médio do mosquito vector. 1 Gametogénese, fertilização e transformação do zigoto; 2- Invasão da matriz peritrófica; 3- Redução do nº de oocinetos invasores no espaço ectoperitrófico; 4- Invasão do epitélio intestinal 5- Adesão dos oocinetos e desenvolvimento dos oocistos. Adaptado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475898013489>.

Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium*. Desenvolvimento no mosquito vector e infecção no hospedeiro mamífero. Adaptado de: <http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS147330990970177X/images?imageId=gr1§ionType=green&hasDownloadImagesLink=true>.

Figura 5. Fases da formação do biofilme por *P. aeruginosa*. 1- Adesão inicial; 2- Adesão irreversível; 3- Maturação I; 4- Maturação II e 5- Dispersão. Adaptado de http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa.

Figura 6. Estrutura química possível do alginato produzido por *P. aeruginosa*, resíduos de ácido D-manurónico intercalados com resíduos de ácido L-gulurónico (Franklin *et al.*, 2011.).

Figura 7. Pupas de *A. stephensi* colocadas a emergir na presença de antibióticos (A) e em água estéril (B).

Figura 8. Copos descartáveis de papel, onde foram colocados os mosquitos, *A. stephensi*, correspondentes a cada grupo de cada experiência. A – Vista lateral e B – Vista superior.

Figura 9. Copos de papel descartáveis com os grupos de mosquitos em estudo durante o tratamento com os isolados de *P. aeruginosa* em meio de cultura LB e em meio LB estéril. A – Vista lateral e B – Vista superior.

Figura 10. Alterações da Microbiota do intestino médio de mosquitos infectados por *P. falciparum*. As barras representam a relação entre a quantidade OTUs e do número de sequências por OTU observadas nos mosquitos infectados em relação aos mosquitos não infectados.

Figura 11. Valores de absorvância para o isolado mucoso e não mucoso de *P. aeruginosa*, para cada intervalo de tempo. Cada intervalo de tempo corresponde a 1 hora e os valores de absorvância foram medidos a um comprimento de onda de 600 nm.

Figura 12. Crescimento bacteriano em meio de cultura de citrimida do isolado não mucoso (à esquerda) e mucoso (à direita) de *P. aeruginosa*. A - Após 24 horas de cultivo e B - Após 48 horas de cultivo.

Figura 13. Taxa de infecção para cada grupo de mosquitos.

Figura 14. Intensidade de infecção para cada grupo de estudo. Control, sem tratamento com antibiótico; PaNM, tratamento com antibiótico e recolonização do intestino médio com *P. aeruginosa* nao-mucosa; PaM; tratamento com antibiótico e recolonização do intestino médio com *P. aeruginosa* mucosa; tratamento com antibiótico sem recolonização do intestino médio.

Lista de Tabelas

Tabela I. Parasitêmias dos murganhos 4 dias após a infecção por ampola e 3 dias após a passagem.

Tabela II. Presença/ausência de crescimento bacteriano dos extractos intestinais dos mosquitos, 24 horas antes e após a refeição sanguínea, decorridas 24 e 48 horas após incubação a 37 °C, em relação a cada grupo de estudo e diluição.

Tabela III. N° de mosquitos infectados com *P. berghei* e não infectados para cada grupo de estudo e respectivas percentagens.

Anexos

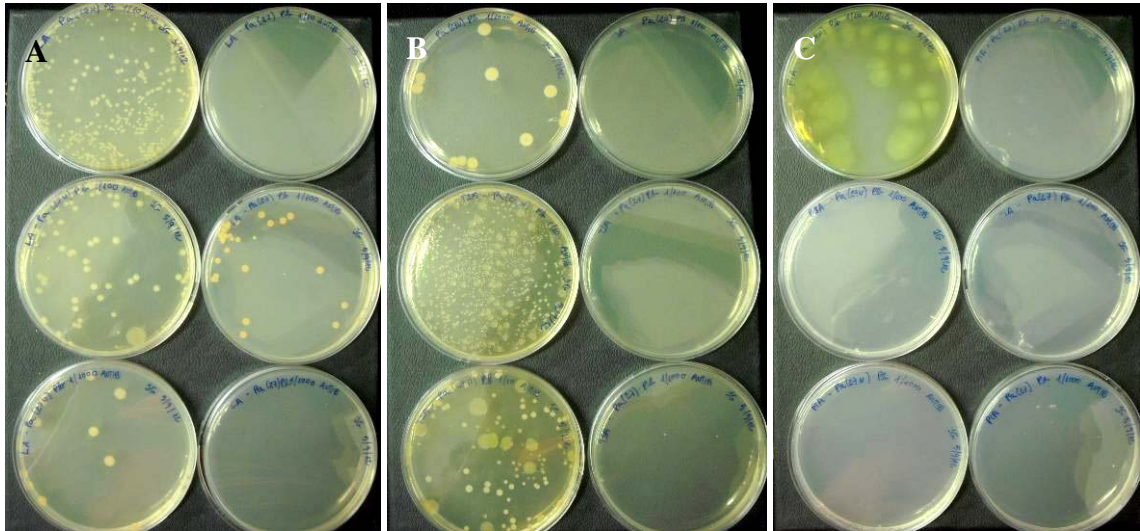
Anexo 1

Valores de absorvância o isolado mucoso e não mucoso de *P. aeruginosa*, para cada intervalo de tempo. Cada intervalo de tempo corresponde a 1 hora e $\lambda = 600$ nm.

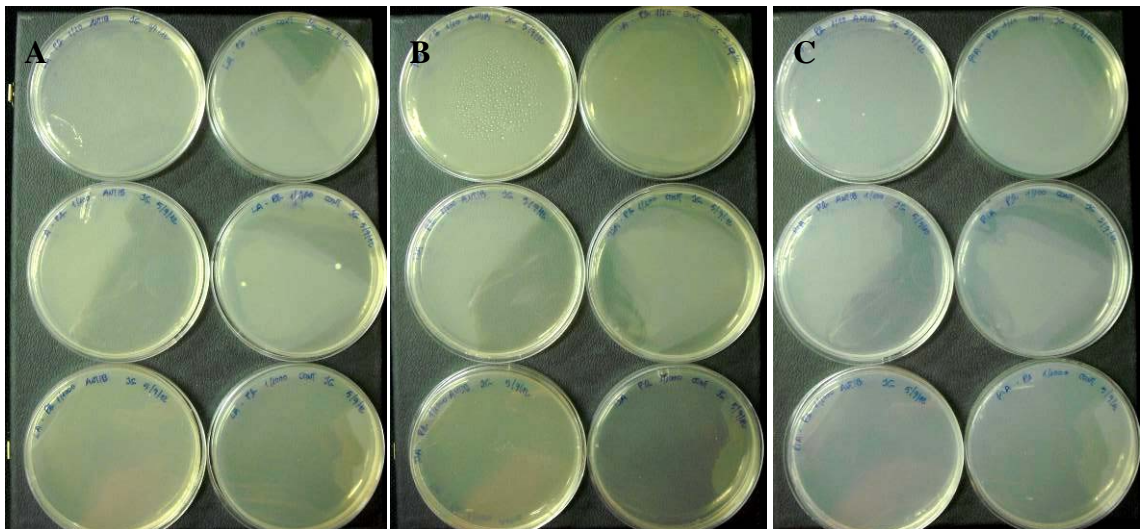
		Tempo										
Abs		T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀
Isolados	Não Mucoso	0,076	0,066	0,071	0,074	0,068	0,074	0,092	1,116	1,165	1,293	1,407
	Mucoso	0,057	0,05	0,053	0,056	0,064	0,075	0,091	1,117	1,166	1,269	1,417

Anexo 2

Inoculação dos extractos dos estômagos para os três meios utilizados, à esquerda PaNM e à direita PaM, 24 H antes da refeição sanguínea e após re-infecção com *Pseudomonas*. Observação 48 H após incubação a 37 °C. A – Meio de cultura LA, B – Meio de cultura TSA e C – Agar de citrimida.

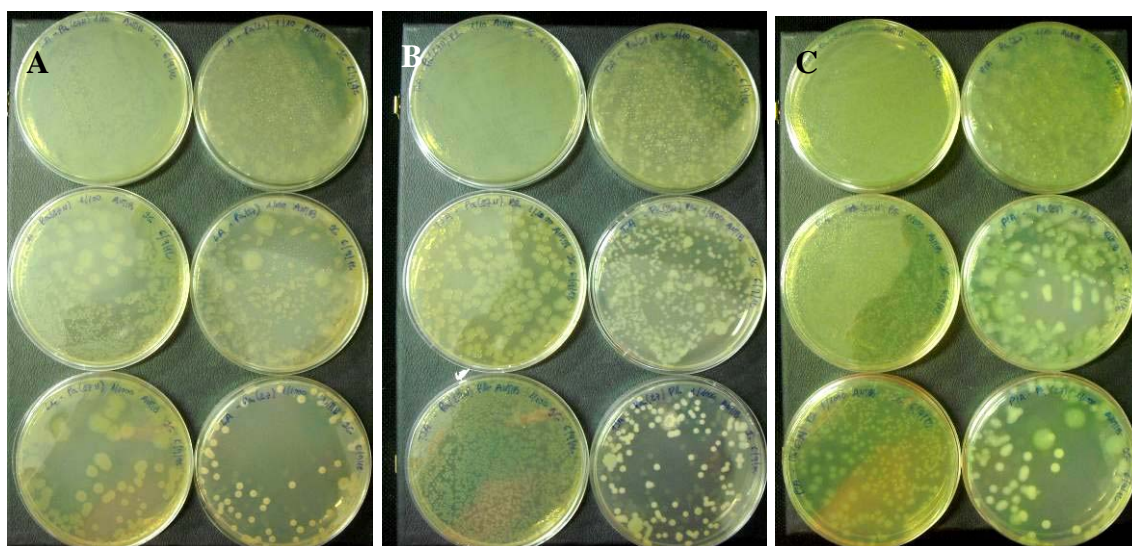


Inoculação dos extractos dos estômagos para os 3 meios utilizados, à esquerda Antib e à direita Cont, 24 H antes da refeição sanguínea. Observação 48 H após incubação a 37 °C. A – Meio de cultura LA, B – Meio de cultura TSA e C – Agar de citrimida.

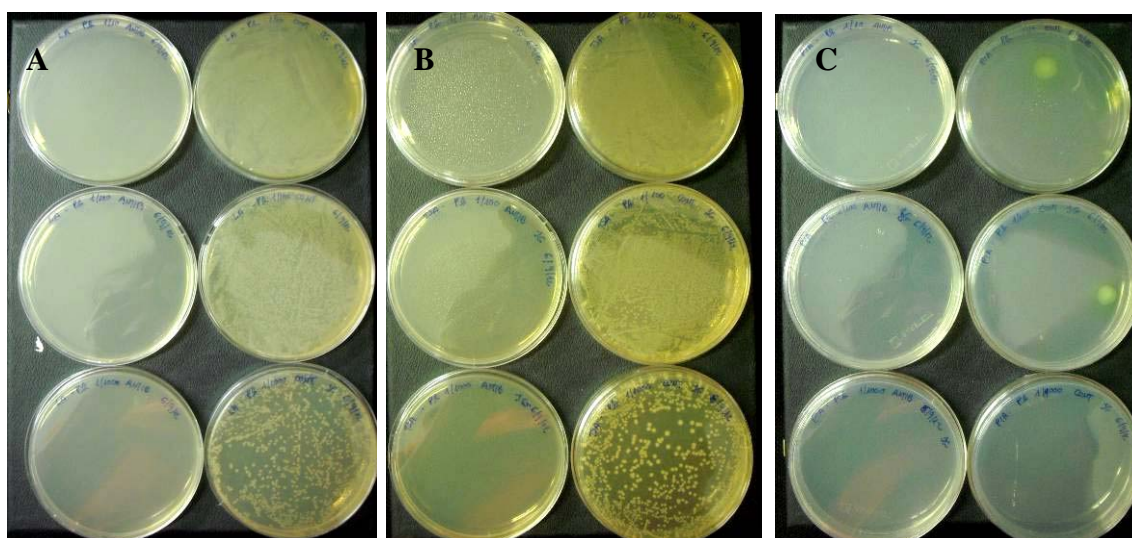


Anexo 3

Inoculação dos extractos dos estômagos para os 3 meios, à esquerda PaNM e à direita PaM, 24 H após refeição sanguínea e após re-infecção com *Pseudomonas*. Observação 48 H após incubação a 37 °C. A – Meio de cultura LA, B – Meio de cultura TSA e C – Agar de citrimida.



Inoculação dos extractos dos estômagos para os 3 meios, à esquerda Antib e à direita Cont, 24 H após refeição sanguínea. Observação 48 H após incubação a 37 °C. A – Meio de cultura LA, B – Meio de cultura TSA e C – Agar de citrimida.



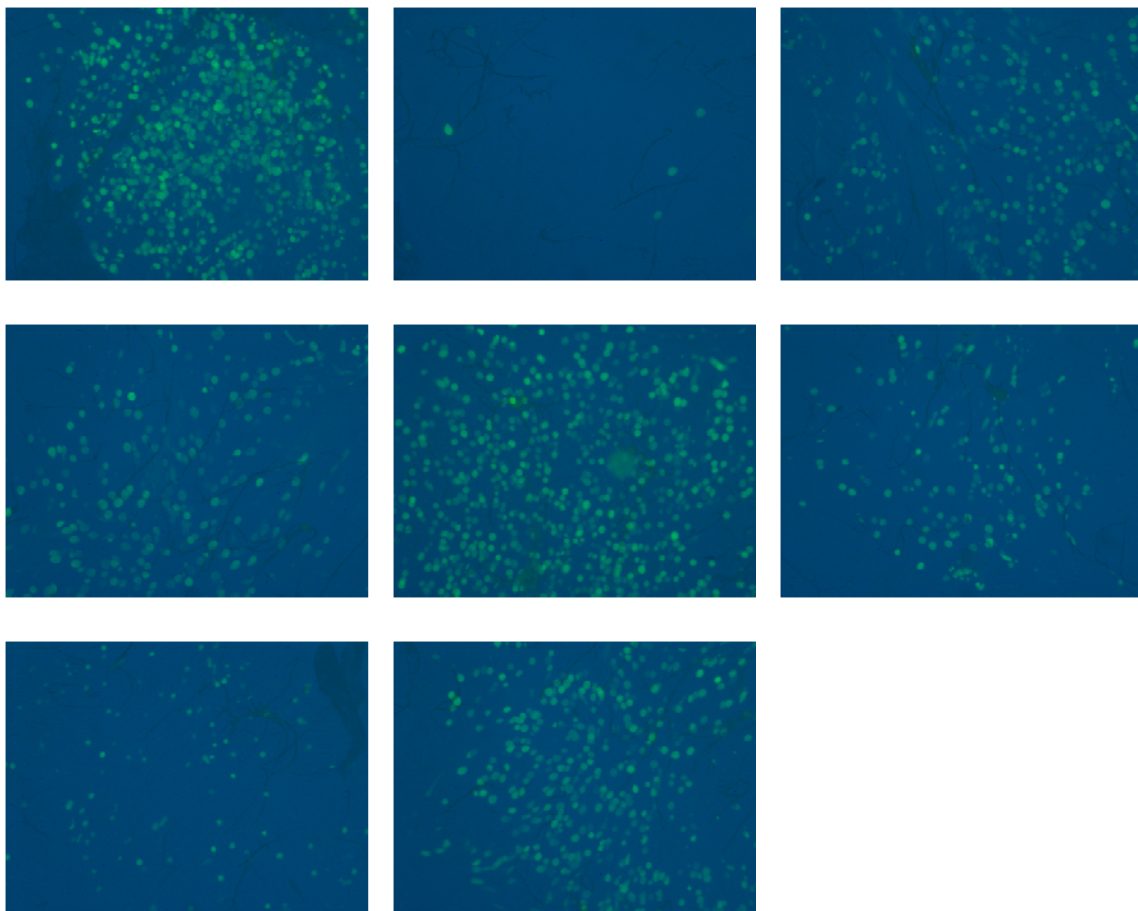
Anexo 4

Nº de oocistos de *P. berghei*, por estômago para cada mosquito de cada grupo de estudo.

Estômago	Oocistos (Nº)			
	Pa NM	Pa M	Antib	Cont
1	0	0	409	0
2	814	347	824	0
3	10	0	911	64
4	470	0	516	511
5	0	0	0	907
6	610	177	0	282
7	893	0	625	0
8	71	0	0	620
9	89	518	0	0
10	309	621	0	897
11		0	743	0
12		75	762	276
13		947	0	0
14		814	741	635
15		409	893	799
16		0	875	812
17		0	0	578
18		883		239
19		68		0
20		0		146
21		0		0
22				164
23				0
24				8
25				0
26				0
27				619
28				598
29				1012
30				215
31				108
32				152
33				721
34				94
35				0
36				0
37				17
38				749
39				0
40				0

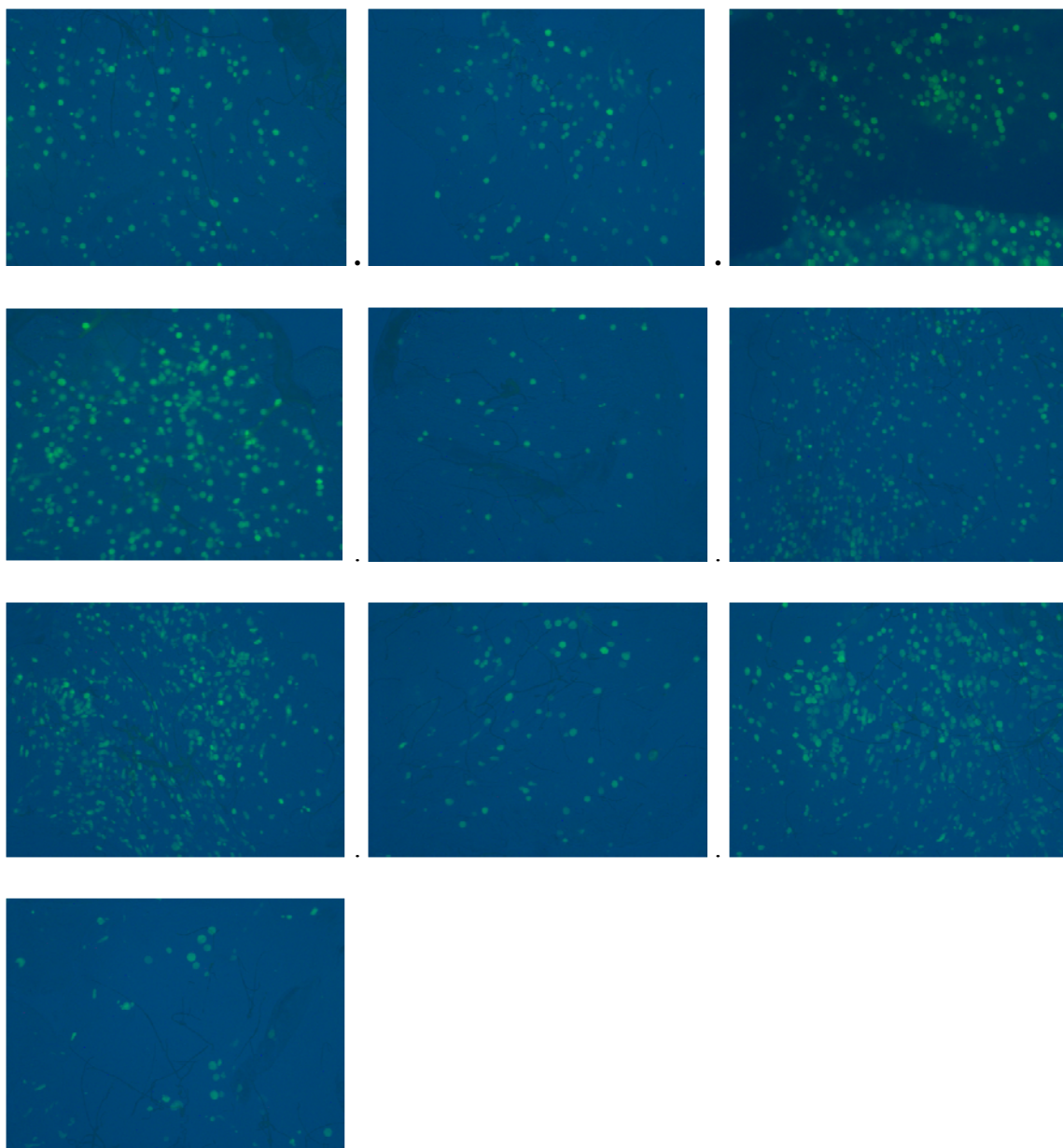
Anexo 5

Fotografias de fluorescência de oocistos de *P. berghei* marcados com GFP, de cada estômago infectado de fêmeas de *A. sethephensi* tratados com antibióticos e re-infectados com um isolado não mucoso de *P. aeruginosa* (grupo PaNM).



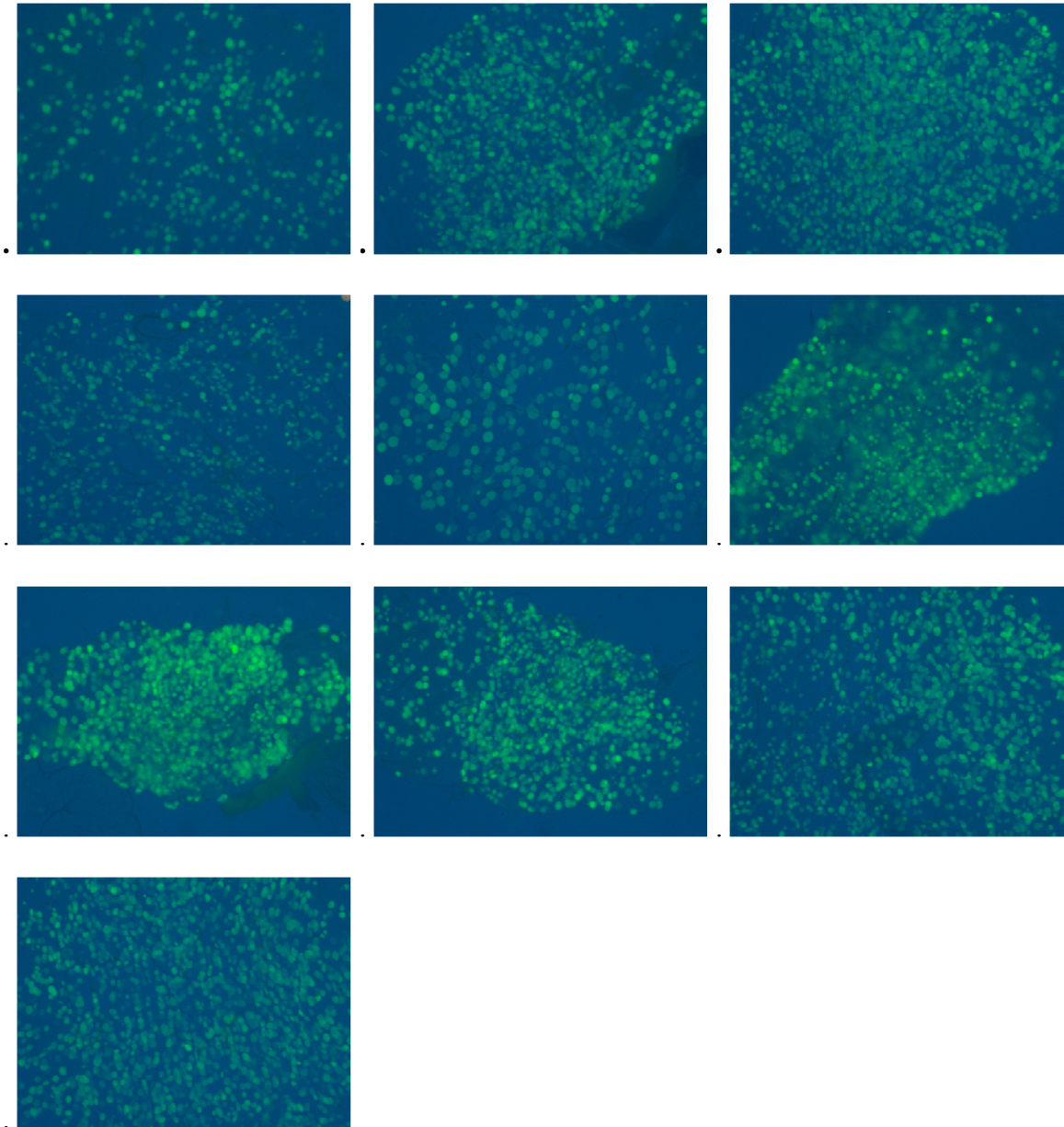
Anexo 6

Fotografias de fluorescência de oocistos de *P. berghei* marcados com GFP, de cada estômago infectado de fêmeas de *A. sethephensi* tratados com antibióticos e re-infectados com um isolado mucoso de *P. aeruginosa* (grupo PaM).



Anexo 7

Fotografias de fluorescência de oocistos de *P. berghei* marcados com GFP, de cada estômago infectado de fêmeas de *A. sethephensi* tratados com antibióticos sem re-infecção por *P. aeruginosa* (grupo Antib).



Anexo 8

Fotografias de fluorescência de oocistos de *P. berghei* marcados com GFP, de cada estômago infectado de fêmeas de *A. sethephensi* sem tratamento antibiótico nem re-infecção com *P. aeruginosa* (grupo Cont).

